

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

Glykohistochemische, immunhistochemische und  
ultrastrukturelle Untersuchungen am Nebenhoden des Pferdes  
(*Equus ferus caballus*)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Marion Silvia Wittmann

aus Starnberg

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Tag der Promotion: 09. Februar 2013



Für meine Eltern



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Der Nebenhoden des Pferdes.....</b>	<b>2</b>
1.1.	Allgemeine Anatomie .....	2
1.1.1.	Die Nebenhodenkanälchen (Ductuli efferentes) .....	2
1.1.2.	Der Nebenhodengang (Ductus epididymidis) .....	4
1.2.	Histologie .....	5
1.2.1.	Das Epithel der Ductuli efferentes .....	5
1.2.2.	Das Epithel des Ductus epididymidis.....	6
1.3.	Funktion .....	9
1.3.1.	Funktion der Ductuli efferentes.....	9
1.3.2.	Funktion des Ductus epididymidis.....	9
<b>2.</b>	<b>Glykohistochemie .....</b>	<b>12</b>
2.1.	Definition Lektin .....	12
2.2.	Struktur und Zuckerbindungseigenschaften der Lektine .....	12
2.3.	Verwendung der Lektine .....	16
2.4.	Lektinbindungsstellen im Nebenhoden .....	17
<b>3.</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>20</b>
3.1.	Das Zytoskelett.....	20
3.2.	Laminin .....	23
3.3.	Cyclooxygenase (COX) I.....	24
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>1.</b>	<b>Untersuchungsmaterial.....</b>	<b>25</b>
<b>2.</b>	<b>Probenentnahme und Fixierung .....</b>	<b>26</b>
2.1.	Probenentnahme .....	26
2.1.1.	Fixierung für lichtmikroskopische Untersuchungen .....	26
2.1.2.	Fixierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen .....	27
<b>3.</b>	<b>Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen.....</b>	<b>29</b>
3.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.).....	29
3.2.	Trichromfärbung nach Masson-Goldner .....	29

3.3.	Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus (PAS-Reaktion).....	30
3.3.1.	PAS-Reaktion mit Amylaseverdau .....	30
3.3.2.	PAS-Reaktion mit Acetylierung.....	30
3.3.3.	PAS-Reaktion mit Methylierung.....	31
3.4.	Alcianblau-Färbung.....	31
3.5.	Sirius Red-Färbung .....	31
<b>4.</b>	<b>Glykohistochemische Färbungen.....</b>	<b>33</b>
4.1.	Färbung mit Biotin konjugierten Lektinen.....	37
4.2.	Färbung mit FITC markierten Lektinen .....	38
<b>5.</b>	<b>Immunhistochemische Färbungen.....</b>	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>Transmissionselektronenmikroskopie.....</b>	<b>45</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
<b>1.</b>	<b>Lichtmikroskopische Untersuchungen am Nebenhoden.....</b>	<b>46</b>
1.1.	Ductuli efferentes .....	47
1.2.	Ductus epididymidis.....	51
1.2.1.	Caput epididymidis bzw. Initialsegment.....	51
1.2.2.	Corpus epididymidis bzw. Mittelsegment.....	56
1.2.3.	Cauda epididymidis bzw. Terminalsegment .....	59
<b>2.</b>	<b>Glykohistochemische Untersuchungen am Nebenhoden.....</b>	<b>62</b>
2.1.	Bindungsstellen für Canavalia ensiformis Agglutinin (Con A).....	62
2.2.	Bindungsstellen für Lens culinaris Agglutinin (LCA).....	63
2.3.	Bindungsstellen für Pisum sativum Agglutinin (PSA) .....	64
2.4.	Bindungsstellen für Arachis hypogaea Agglutinin (PNA).....	64
2.5.	Bindungsstellen für Ricinus communis Agglutinin (RCA) .....	65
2.6.	Bindungsstellen für Erythrina cristagalli Agglutinin (ECA).....	65
2.7.	Bindungsstellen für Glycine max Agglutinin (SBA) .....	65
2.8.	Bindungsstellen für Griffonia simplicifolia Agglutinin (GSL I) .....	65
2.9.	Bindungsstellen für Saphora japonica Agglutinin (SJA) .....	65
2.10.	Bindungsstellen für Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) .....	66
2.11.	Bindungsstellen für Triticum vulgare Agglutinin (WGA).....	66
2.12.	Bindungsstellen für Triticum vulgare Agglutinin s (WGAs).....	67
2.13.	Bindungsstellen für Ulex europaeus I Agglutinin (UEA I).....	68
2.14.	Bindungsstellen für Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E).....	68

2.15.	Bindungsstellen für Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L).....	69
2.16.	Bindungsstellen für Sambucus nigra Agglutinin (SNA).....	69
2.17.	Bindungsstellen für Maackia amurensis I Leukoagglutinin (MAA I) .....	70
2.18.	Bindungsstellen für Viscum album Agglutinin (VAA) .....	70
<b>3.</b>	<b>Immunhistochemische Untersuchungen am Nebenhoden .....</b>	<b>74</b>
3.1.	Immunhistochemischer Nachweis von „ $\alpha$ -smooth-muscle-actin“ .....	74
3.2.	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin .....	77
3.3.	Immunhistochemischer Nachweis von Laminin .....	80
3.4.	Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin.....	83
3.5.	Immunhistochemischer Nachweis der Cytokeratine.....	86
3.5.1.	Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 5.....	86
3.5.2.	Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 7.....	89
3.5.3.	Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 8.....	89
3.5.4.	Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 14.....	92
3.5.5.	Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 18.....	95
3.5.6.	Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 19.....	98
3.6.	Immunhistochemischer Nachweis der Cyclooxygenase (COX) I .....	101
<b>4.</b>	<b>Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Nebenhoden .....</b>	<b>104</b>
4.1.	Ultrastruktur der Ductuli efferentes .....	104
4.2.	Ultrastruktur des Ductus epididymidis.....	111
4.2.1.	Ultrastruktur des Initialsegments .....	111
4.2.2.	Ultrastruktur des Mittelsegments .....	119
4.2.3.	Ultrastruktur des Terminalsegments .....	126
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>132</b>
<b>1.</b>	<b>Ductuli efferentes.....</b>	<b>132</b>
1.1.	Glykohistochemie.....	135
1.2.	Immunhistochemie .....	137
<b>2.</b>	<b>Ductus epididymidis.....</b>	<b>139</b>
2.1.	Initialsegment .....	139
2.1.1.	Glykohistochemie.....	141
2.1.2.	Immunhistochemie .....	142
2.2.	Mittelsegment.....	143
2.2.1.	Glykohistochemie.....	145

---

2.2.2.	Immunhistochemie .....	146
2.3.	Terminalsegment .....	147
2.3.1.	Glykohistochemie.....	148
2.3.2.	Immunhistochemie .....	150
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>152</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>154</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>156</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>168</b>
<b>X.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>169</b>
<b>XI.</b>	<b>BILDERVERZEICHNIS .....</b>	<b>170</b>
<b>XII.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>173</b>
<b>1.</b>	<b>Methodik - Lichtmikroskopie .....</b>	<b>173</b>
1.1.	Fixierungslösungen .....	173
1.2.	Lösungen .....	174
<b>2.</b>	<b>Methodik - Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>177</b>
2.1.	Fixierungslösung nach Karnovsky .....	177
2.2.	Cacodylat-Puffer .....	177
2.3.	Lösungen .....	178
<b>XIII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>181</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AA	Arachidonsäure
AES	Apikaler Epithelsaum
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
AZK	Apikalzellkern
biot.	biotinyliert
BG	Bindegewebe
BL	Basallamina
BPA	Bauhinia purpurea Agglutinin
BZ	Basalzelle
BZK	Basalzellkern
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD22	Siglec-2
CFTR	Cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator
CK	Cytokeratin
Con A	Canavalia ensiformis Agglutinin
COX I	Cyclooxygenase I
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
D. eff.	Ductuli efferentes
D. ep.	Ductus epididymidis
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
DNA	Deoxyribonucleic acid
E	Epithel
ECA	Erythrina cristagalli Agglutinin
et. al.	et alii, et aliae
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FMP	forward motility protein
Fuc	Fukose
G	Gefäß
GA	Golgi-Apparat
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GFAP	Glial Fibrillary Acidin Protein
GJ	gap junctions
Glc	Glukose

---

GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GPX	Glutathione Peroxidase
GR	Granula
GSL = GSA I	Griffonia simplicifolia Agglutinin 1
H	Hoden
HC	Heterochromatin
HE1/CTP	Cholesterol Transfer Protein
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HPA	Helix pomatia Agglutinin
HRP	Horseradish peroxidase
HZ	Hauptzelle
HZK	Hauptzellkern
JAC	Jacalin = Artocarpus integrifolia Agglutinin
KF	Kollagenfasern
KZ	Kinozilien
LAA	Laburnum alpinum Agglutinin
LacNAc	N-Acetylactosamin
LBA	Phaseolus limensis Agglutinin
LCA	Lens culinaris Agglutinin
LFA	Limax flavus Agglutinin
Lig.	Ligamentum
LPA	Limulus polyphemus Agglutinin
LS	Lysosom
LTA	Lotus tetragonolobus Agglutinin
LU	Lumen
LY	Lymphozyt
M	Muskelschicht
MA	Makrophage
MAA I	Maackia amurensis I Leukoagglutinin
Man	Mannose
MI	Mitochondrien
MPA	Maclura pomifera Agglutinin
MPL	Membranphospholipid
MV	Mikrovilli
MZK	Muskelzellkern
NeuNAc = Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
NF-L	Light neurofilament protein
NF-M	Medium neurofilament protein



---

NF-H	Heavy neurofilament protein
PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphate buffered saline-Puffer
PGD2	Prostaglandin D2
PGDS	Prostaglandin-D-Synthase
PGE2	Prostaglandin E2
PGF2 $\alpha$	Prostaglandin F2 $\alpha$
PGG2	Prostaglandin G2
PGH2	Prostaglandin H2
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin
PLA2	Phospholipase A2
PNA	Arachis hypogaea Agglutinin
Proc.	Processus
PSA	Pisum sativum Agglutinin
RCA	Ricinus communis Agglutinin
SB	Scalebar
SBA	Glycine max Agglutinin
SJA	Saphora japonica Agglutinin
SMA	Smooth muscle actin
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
SP	Spermien
SPK	Spermienkopf
SPM	Spermienmittelstück
SPS	Spermienschwanz
STA	Solanum tuberosum Agglutinin
SZ	Stereozilien
TJ	tight junctions
UEA I	Ulex europaeus Agglutinin I
VA	Vakuole
VAA	Viscum album Agglutinin
VS	Vesikel
VVA	Vicia villosa Agglutinin
WGA(s)	Triticum vulgare Agglutinin (succinyliert)
ZA	Zonulae adherentes
ZF	Zellfragment
ZK	Zellkern
ZNS	Zentrales Nervensystem

---

ZZ	Zilienzeile
ZZK	Zilienzellkern

## **I. EINLEITUNG**

Die Reproduktion in der Pferdemedizin ist wirtschaftlich von sehr großer Bedeutung. Die Spermienqualität eines Hengstes im Deckeinsatz ist dabei ein zentrales Thema. Da die Spermien im Laufe des Nebenhodenganges ihre Befruchtungsfähigkeit erhalten, ist dieses Organ als Ursache von Fruchtbarkeitsstörungen von Interesse. Vor allem Nebenhodenentzündungen (Epididymitis) haben in den meisten Fällen gravierende Auswirkungen auf die Ejakulatsbeschaffenheit (BADER, 2006). Daneben kann auch bei der Kastration der Nebenhoden eine wichtige Rolle spielen. Wenn dieser nicht vollständig entfernt wird, kann es auch nach der Kastration zu hengstigem Verhalten kommen und es muss erneut operiert werden (GERHARDS, 2003).

Der Nebenhoden beim Pferd wurde bereits 1939 auf seine Länge untersucht (GHETIE, 1939). Seither wurde unter anderem über die Einteilung des Nebenhodens anhand der regionären Histologie und Zytochemie (NICANDER, 1958), die Spermatogenese im Nebenhoden des Pferdes (SWIERSTRA et al., 1974), die Verbindung zwischen Hodenkanälchen und Ductuli efferentes beim Hengst (AMANN et al., 1977), den Aufenthalt der Spermien im Nebenhodengang (AMANN et al., 1979; NADEN et al., 1990), über Lektinbindungsstellen im Nebenhoden des Pferdes (PARILLO et al., 1997, 1998) und von Kuhrau (1994) über histologische, ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen am Pferdenebenhoden geschrieben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen mit bereits vorhandenen Befunden aus früheren Arbeiten über den Nebenhoden des Pferdes verglichen und diskutiert werden sowie diese ergänzen. Mit konventionellen lichtmikroskopischen, ultrastrukturellen, immun- und glykohistochemischen Methoden wurde die Morphologie des equinen Nebenhodens in meiner Arbeit untersucht.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Der Nebenhoden des Pferdes**

#### **1.1. Allgemeine Anatomie**

Der Nebenhoden (Epidiymidis) lässt sich bereits makroskopisch in drei Abschnitte, den Nebenhodenkopf (Caput), den Nebenhodenkörper (Corpus) und den Nebenhodenschwanz (Cauda) unterteilen (NICKEL et al., 2004).

Er fügt sich dem beim Pferd horizontal liegenden Hoden dorsal in Längsrichtung an, wobei das Caput kaum, die Cauda jedoch deutlich über den Hodenpol hinausragt. Das Corpus begrenzt gemeinsam mit dem Hoden die lateral liegende Hodentasche (Bursa testicularis) (BUDRAS, 2009).

Der Nebenhoden ist durch das Nebenhodengekröse (Mesoepididymidis) und das Ligamentum (Lig.) testis proprium am Hoden und durch das Lig. caudae epididymidis am Grund des Processus (Proc.) vaginalis gut fixiert. Das Lig. caudae epididymidis sendet Fasern bis in die Unterhaut der beim Hengst und Eber sehr kräftigen Hodenhüllen (KÖNIG & LIEBICH, 2002). In diesen Hodenhüllen befindet sich der Nebenhoden gemeinsam mit dem Hoden (BUSCH & HOLZMANN, 2001).

Aus dem Hodennetz (Rete testis) im Hoden formieren sich die Ductuli efferentes, die an der Extremitas capitata des Hodens die Tunica albuginea durchstoßen und in den Nebenhodenkopf übergehen (NICKEL et al., 2004). Die in Schlingen gelegten Kanälchen liegen in tierartlich unterschiedlicher Anzahl, beim Hengst 14 bis 17 vor (HEMEIDA et al., 1978). Die Ductuli efferentes vereinigen sich zu dem beim Hengst 72 - 81 m langen, stark gewundenen Nebenhodenkanal (Ductus epididymidis). Von Bindegewebe eingehüllt bildet er den Nebenhodenkörper und -schwanz. Im Anschluss geht er in den Samenleiter (Ductus deferens) über (NICKEL et al., 2004).

##### **1.1.1. Die Nebenhodenkanälchen (Ductuli efferentes)**

Über die 1668 von De Graaf zuerst beschriebenen Ductuli efferentes war man sich lange Zeit weder über die Terminologie noch über die Zugehörigkeit zu Hoden oder Nebenhoden einig. Inzwischen gehören sie als „Ductuli efferentes“ offiziell

zum Caput epididymidis (ILIO & HESS, 1994).

Die hier stark geschlängelt verlaufenden Kanälchen, werden durch Bindegewebe zu kleinen Läppchen (Lobuli epididymidis) zusammengefasst und sind innerhalb dieser Läppchen von gefäßreichem Bindegewebe und glatter Muskulatur umgeben (NICKEL et al., 2004).

Das runde, glatte Lumen ist proximal mit einem Durchmesser von 200 µm beim Pferd relativ groß, nimmt nach distal bis auf 50 µm ab um sich dann wieder kurz vor der Einmündung in den Ductus epididymidis auf etwa 120 µm zu erweitern (KUHLAU, 1994).

Nicht alle der 14 bis 17 Kanälchen sind an der Vereinigung zum Ductus epididymidis beteiligt. Blind endende, sogenannte Ductuli aberrantes kommen vor allem beim Hengst und Bullen vor. Man unterscheidet hierbei die mit Ursprung im Rete testis zu den blind-endenden Kanälchen mit epididymalen Ursprung (HEMEIDA et al., 1978).

Abbildung 1 zeigt die zwei Möglichkeiten, wie die Ductuli efferentes in den Ductus epididymidis bei Säugetieren übergehen können. Dabei gehört der Hengst zur zweiten Variante, bei der parallel zueinander verlaufende Kanälchen mehrere Eintrittspforten zum Ductus epididymidis bilden (Abbildung 1 (B-E)). Bei der ersten Variante laufen alle Ductuli zu einem Kanal zusammen, der dann in den Ductus epididymidis übergeht (Abbildung 1 (A)) (ILIO & HESS, 1994).

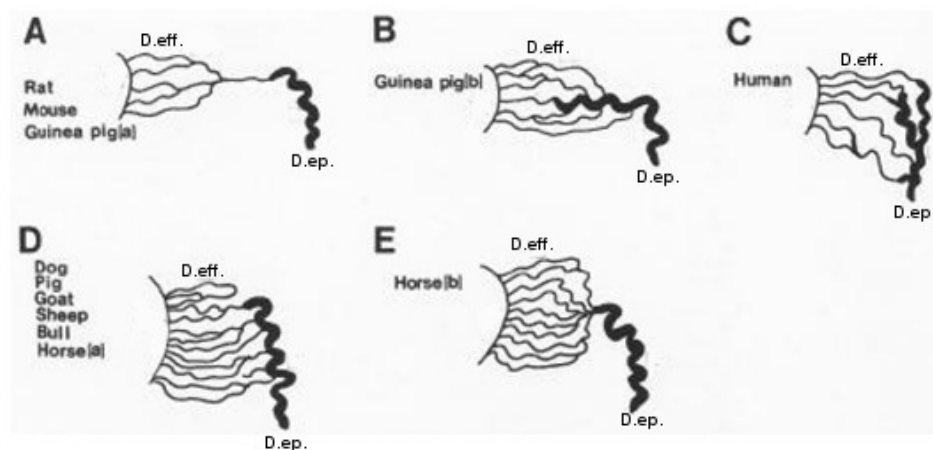


Abbildung 1 Schematische Darstellung des speziesspezifischen Übergangs der Ductuli efferentes (D. eff.) in den Ductus epididymidis (D. ep.) modifiziert nach Ilio und Hess (ILIO & HESS, 1994).

### **1.1.2. Der Nebenhodengang (Ductus epididymidis)**

Der aus den Ductuli efferentes entstehende Ductus epididymidis liegt in vielen engen, durch Bindegewebe zusammengehaltenen Schlingen und erstreckt sich beim Pferd dadurch auf 72 - 81 m. Er bildet die Grundlage des distalen Caput, des gesamten Corpus und der Cauda epididymidis. Am Ende des Ductus epididymidis erfolgt der Übergang zum Samenleiter (Ductus deferens) (NICKEL et al., 2004).

Die makroskopische Unterteilung des Nebenhodengangs in Caput, Corpus und Cauda epididymidis geht einher mit der Gliederung in drei Segmente: Initial-, Mittel- und Terminalsegment (GLOVER & NICANDER, 1971). Hier bilden die Ductuli efferentes und das Initialsegment den Hauptteil des Caput, das Mittelsegment das distale Caput und das Corpus und das Terminalsegment die Cauda epididymidis.

Mit dieser histologischen und zytologischen Unterteilung des Nebenhodengangs in drei Abschnitte wird man jedoch einigen funktionellen und strukturellen Besonderheiten nicht gerecht. So wird er nach histologischen, histochemischen und ultrastrukturellen Eigenschaften bei verschiedenen Tierarten in eine unterschiedliche Anzahl von Segmenten unterteilt. Während beim Kater (SANCHEZ et al., 1998) und beim Rüden vier Segmente unterschieden werden (CHANDLER et al., 1981), unterteilt man beim Kaninchen in acht (NICANDER, 1957) und beim Bullen, Schafbock und Hengst in sechs Segmente (NICANDER, 1958). Die Einteilung beim Hengst erfolgt auf Grund der Größe, Position und Form des Zellkerns und der Epithelhöhe.

## **1.2. Histologie**

### **1.2.1. Das Epithel der Ductuli efferentes**

Die Kanälchen werden von einem unterschiedlich hohen, mehrreihigen Epithel ausgekleidet (ILIO & HESS, 1994; HESS & SINOWATZ, 2000; BUSCH & HOLZMANN, 2001). Beim Pferd ist die Epithelhöhe am Anfang etwa 22 µm und weiter distal 32 µm (KUHRAU, 1994).

Es besteht aus resorptiv tätigen Hauptzellen, die keine Zilien an ihrer luminalen Oberfläche tragen und Zellen mit apikalen Kinozilien. Bei manchen Spezies wird das Vorkommen von Basalzellen, intraepithelial gelegene Makrophagen und Lymphozyten erwähnt (HESS, 2002).

Die niedrigeren Hauptzellen mit oberflächlichem Mikrovilli-Besatz enthalten eine große Anzahl an mikropinozytotischen Vesikeln, Lysosomen und einen gut entwickelten Golgi-Apparat, was auf eine hohe Resorptionsfähigkeit hinweist (LIEBICH, 2004). Beim Pferd sind diese Zellen heller und ihr Kern ist längsoval, 7 x 4,5 µm groß und liegt in der unteren Zellhälfte. Die verschieden dichten Granula und Vesikel liegen vorwiegend im supranukleären Raum. Aufgrund der vielen Vakuolen erscheint das apikale Zytoplasma aufgelockert (KUHRAU, 1994). Mittels lysosomaler Enzyme finden in diesen Vakuolen intrazelluläre Verdauungsprozesse statt, die als PAS-positive Granula in verschiedener Menge und Größe sichtbar werden (WROBEL, 1990).

Beim Pferd sind die Zilienzellen der Ductuli efferentes aufgrund des dichteren Zytoplasmas etwas dunkler als die Hauptzellen. Der Kern liegt in der luminalen Zellhälfte und ist etwa 6,5 x 3 µm groß. Die luminalen Kinozilien sind etwa 8 µm lang (KUHRAU, 1994) und aktiv beweglich.

Das Verhältnis zwischen zilientragenden Zellen und Hauptzellen verändert sich im Verlauf der Ductuli efferentes. Im Anfangsabschnitt kommen allgemein mehr zilienlose Hauptzellen vor. In Richtung Ductus epididymidis steigt die Anzahl der zilientragenden Zellen immer weiter an (ILIO & HESS, 1994).

An die Basallamina des Epithels schließt sich nach außen eine dünne, zirkuläre Schicht modifizierter glatter Muskelzellen (Stratum fibromusculare) an (LIEBICH, 2004).

### 1.2.2. Das Epithel des Ductus epididymidis

Das Epithel des Ductus epididymidis ist durchgehend zweireihig hochprismatisch. Es setzt sich aus schlanken, hochprismatischen mit Mikrovilli (Stereozilien) besetzten Hauptzellen und kleinen polygonalen Basalzellen zusammen (HEES & SINOWATZ, 2000). Trotz der einheitlichen Epithelform unterscheiden sich die einzelnen Abschnitte des Ductus epididymidis unter anderem durch Epithelhöhe, Stereozilienlänge, Lage des Zellkerns und Vorkommen bestimmter Zelltypen.

Neben den Hauptzellen und Basalzellen werden je nach Tierart und Nebenhodenabschnitt auch noch Apikalzellen, „narrow cells“, „clear cells“ und „halo cells“ beschrieben (ROBAIRE & HINTON, 2002).

Abbildung 2 zeigt eine schematische Abbildung der beschriebenen Zellen.

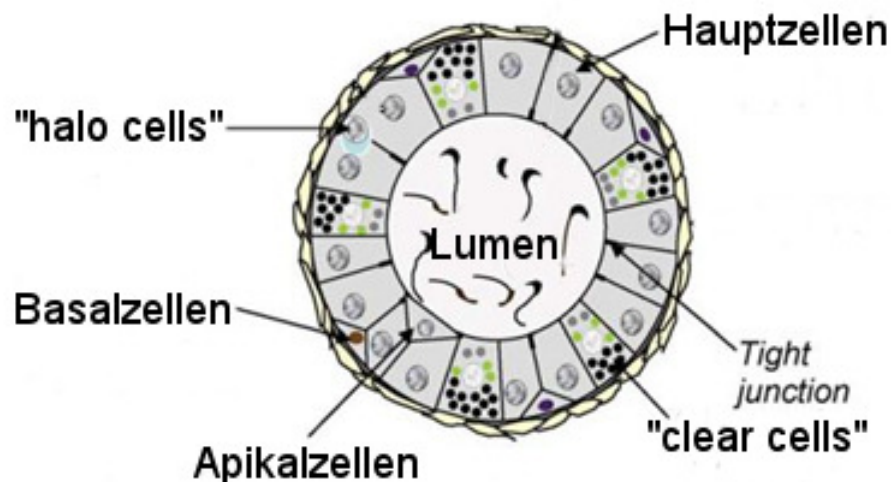


Abbildung 2 Schematisches Darstellung der zellulären Organisation einer repräsentativen Zelle aus der Nebenhoden der Ratte. Modifiziert nach (CORNWALL, 2009).



Die überwiegend vorkommenden Hauptzellen sitzen der Basalmembran auf und erreichen immer das Ganglumen (ROBAIRE & HINTON, 2002). Ihr längsovaler Zellkern befindet sich in der unteren Zellhälfte. Die Mitochondrien liegen unterhalb und der gut ausgebildete Golgi-Apparat liegt oberhalb des Kerns (NICANDER, 1958). Das Antreffen und die Anordnung dieser und anderer Zellbestandteile, wie des endoplasmatischen Retikulums, der Lysosomen und Endosomen ist sowohl tierartlich als auch je nach Nebenhodenabschnitt unterschiedlich und Zeichen für die sekretorische und resorbierende Fähigkeit des jeweiligen Abschnittes (ROBAIRE & HINTON, 2002). Die ins Ganglumen ragenden Stereozilien der Hauptzellen sind zum Teil büschelartig verklebt (LIEBICH, 2004).

Die kleinen polygonalen Basalzellen liegen an der Epithelbasis. Sie haben beim Hengst einen runden bis querovalen, hellen Kern. Das wenige Zytoplasma besitzt nur wenig Zellorganellen, kann jedoch Glykogengranula und Lipidtröpfchen enthalten (NICANDER, 1958). Ausläufer der Basalzellen die bis an das Ganglumen reichen (SHUM et al., 2008) sollen an der pH-Wert-Regulierung im Lumen beteiligt sein (SHUM et al., 2009).

Die Apikalzellen liegen immer direkt an der lumennahen Epithelgrenze und tragen an der apikalen Membran Stereozilien. Verglichen mit den Stereozilien der Hauptzellen sind sie kürzer und in geringerer Anzahl vorhanden. Offenbar berühren die Apikalzellen die Basalmembran nicht. Ihr dunkler Kern wird von einem schmalen Zytoplasma-Saum eingerahmt. Ihr Zytoplasma beinhaltet eine Vielzahl von Mitochondrien umgeben von rauem endoplasmatischen Retikulum. Im apikalen Bereich befinden sich Lysosomen, Vesikel und Vakuolen unterschiedlicher Größe und Inhalts (PALACIOS et al., 1991).

Die „narrow cells“ sind schlanke Zellen in Stiftchenform und nur über einen dünnen Ausläufer mit der Basalmembran verbunden. Der Zellkern und alle Zellorganellen liegen im etwas breiteren apikalen Bereich (ROBAIRE & HINTON, 2002). Die „narrow cells“ treten in geringer Anzahl und nur im Initialsegment auf (SHUM et al., 2009).

Die „clear cells“ sind helle Zellen mit rundem Zellkern und deutlich weniger Stereozilien als die Hauptzellen. Im apikalen Zytoplasma sind zahlreiche Vesikel, Endosomen, „coated pits“, „multivesicular bodies“, Lysosomen verschiedener

Größe und Lipid-Tropfen zu finden (ROBAIRE & HINTON, 2002). Die „hellen Zellen“ kommen bis auf im Initialsegment in allen Abschnitten des Ductus epididymidis und im Anfangsteil des Ductus deferens vor (SHUM et al., 2009).

Die „halo cells“ sind die Haupt-Immunzellen des Nebenhodens (CORNWALL, 2009). Die kleinen runden Zellen umfassen T-Helferzellen, zytotoxische T-Lymphozyten und eventuell auch Makrophagen (ROBAIRE & HINTON, 2002).

Die glatte Muskelschicht, die den Nebenhodengang außerhalb der Basallamina umgibt, nimmt an Stärke im Laufe des Ductus epididymidis zu. Auch die Weite des Kanallumens und die Anzahl der darin liegenden Spermien nimmt zu (HEES & SINOWATZ, 2000).

### **1.3. Funktion**

#### **1.3.1. Funktion der Ductuli efferentes**

Die Ductuli efferentes sind als Verbindung zwischen Hoden und Nebenhoden für den kontinuierlichen Weitertransport des aus dem Hoden stammenden Sekrets und der noch nicht beweglichen Spermien zuständig (NICKEL et al., 2004). Hierfür spielen die Kinozilien des Epithels eine wichtige Rolle (LIEBICH, 2004).

Die Zellorganellen und Einschlüsse der Hauptzellen sind für die Resorption von Samenflüssigkeit zuständig (LIEBICH, 2004). Im Epithel der Ductuli efferentes und im Anfangsabschnitt des Ductus epididymidis wird mehr als 90 % der testikulären Flüssigkeit rückresorbiert (HEES & SINOWATZ, 2000).

Nicht nur Resorption sondern auch Sekretion von Proteinen und Glykokonjugaten für die Spermienernährung findet hier statt. Ausserdem werden durch Phagozytose Spermien aus dem Lumen aufgenommen (Spermiophagie) (HESS, 2002).

#### **1.3.2. Funktion des Ductus epididymidis**

Der Ductus epididymidis hat zwei Hauptfunktionen: Erstens schafft er ein einzigartiges Milieu im Lumen, welches aus unbeweglichen, unfruchtbaren, testikulären Spermatozoen vollständig bewegliche, intakte Zellen macht und zweitens lagert er fruchtbare Spermien im Bereich der Cauda epididymidis und des Vas deferens überlebensfähig bis zur Ejakulation ein (JONES, 2004).

Befruchtungsfähige Spermatozoa sind das Ergebnis von einer schrittweisen Serie von komplexen Veränderungen in dessen Morphologie und Oberfläche. Dies findet in den verschiedenen Abschnitten des Ductus epididymidis statt. Die Durchlaufzeit der Spermien durch den Nebenhodengang dauert beim Hengst 7,5 bis 11 Tage (GEBAUER et al., 1974).

Das Medium, das die Spermien umgibt verändert sich im Laufe des Nebenhodengangs ständig. Ein Großteil der testikulären Flüssigkeit wird direkt in den Ductuli efferentes und im Initialsegment des Caputs resorbiert. So sind die meisten Proteine in der epididymalen Flüssigkeit Sekretionsprodukte aus dem epididymalen Epithel. In jedem der darauf folgenden Abschnitte werden spezifische Komponenten der Flüssigkeit zugesetzt, wobei das Caput und Corpus dabei am effektivsten arbeiten (DACHEUX et al., 2003).

Beim Hengst wurden allein im Lumen des Nebenhodengangs 201 verschiedene Proteine gefunden. Die in der Flüssigkeit am meisten vorkommenden Proteine sind Albumin, Lactoferrin, Prostaglandin-D-Synthase (PGDS), Glutathione Peroxidase (GPX), Cholesterol Transfer Protein (HE1/CTP) und Hexosaminidase. Zusätzlich dazu wurden 117 Proteine, eingeschlossen im Epithel in den verschiedenen Nebenhodenabschnitten nachgewiesen. Insgesamt machen 18 Proteine 92,6 % der gesamten epididymalen Sekretion aus (FOUCHECOURT et al., 2000).

Parallel zur Änderung in der Zusammensetzung der epididymalen Flüssigkeit, verändert sich auch die Plasmamembran der Spermien. Das geschieht durch Abbau oder Freisetzung von testikulären Komponenten, Absorption und Integration von aus dem Nebenhodenepithel stammenden Proteinen und Veränderung der Oberfläche durch Reaktionen von Enzymen mit spezifischen Proteinen wie Glykosilierung und Deglykosilierung (DACHEUX et al., 2003). An der Plasmamembran ändert sich im Laufe der Nebenhodenpassage auch die Lipidzusammensetzung und die Zuckerzusammensetzung der Glykoproteine (RÜSSE & SINOWATZ, 1998).

Bei der Reifung der Samenzelle kommt es außerdem zur Ablösung bzw. Kaudalverlagerung des Zytoplasmatröpfchens, welches beim Pferd erst im unteren Teil des proximalen Corpus beginnt (NICANDER, 1958). Die Aufnahme des zytoplasmatischen Tropfens durch das Epithel ist Aufgabe der „clear cells“ (CORNWALL, 2009).

Veränderungen der Größe, Form und Ultrastruktur des Akrosoms durch dort stattfindende Umstrukturierungen sind zwar beim Chinchilla und Meerschweinchen besonders ausgeprägt, bei den übrigen Haussäugetieren jedoch kaum zu beobachten (RÜSSE & SINOWATZ, 1998).

Im Rahmen der epididymalen Spermienreifung stellt sich auch der Stoffwechsel der Spermien während der Passage durch den Nebenhodengang um (RÜSSE & SINOWATZ, 1998).

Die Entwicklung der Vorwärtsbewegung der Spermien im Laufe des Nebenhodengangs ist besonders wichtig. Während Spermien im Caput epididymidis weitgehend unbeweglich sind oder höchstens unkoordinierte Bewegungen erkennen lassen, zeigen sie in der Cauda eine gerichtete

Vorwärtsbewegung. Dies wird einerseits auf die Ausbildung zusätzlicher Disulfidbrücken in den Fibrillen des Spermischwanzes zurückgeführt (RÜSSE & SINOWATZ, 1998) andererseits spielt auch hier wieder die Sekretion eines Proteins, das „forward motility protein“ (FMP) aus dem Epithel eine wichtige Rolle (ACOTT & HOSKINS, 1978). Daneben ist der im Nebenhodensekret herrschende pH-Wert für die Beweglichkeit der Spermien von Bedeutung (CARR & ACOTT, 1984). Die Einstellung des pH-Wertes in den verschiedenen Nebenhodenabschnitten erfolgt durch Interaktion von Hauptzellen, Basalzellen und „clear cells“. In den vorderen Abschnitten des Nebenhodengangs geben die Hauptzellen Bicarbonat in das Lumen ab und fördern so die Reifung der Spermien durch Erhöhung des pH-Wertes. Weiter distal geben die „clear cells“ Wasserstoffionen ab, senken den pH-Wert und sorgen damit für eine bessere Speicherung der Spermien durch deren Ruhigstellung (SHUM et al., 2009).

In der Cauda epididymidis können Spermien längere Zeit lebensfähig gelagert werden. Auf Dauer kommt es dennoch zu Alterungsprozessen und damit zum Verlust der Samenmotilität und Befruchtungsfähigkeit. Auch von sexuell nicht aktiven Hengsten werden Spermien ständig aus der Cauda über den Ductus deferens in die Urethra weitertransportiert und beim Harnabsatz abgeschwemmt. So wird eine Überalterung der Spermienreserve in der Cauda epididymidis verhindert. Die Aufenthaltsdauer der Spermien im Nebenhodenschwanz liegt bei sexuell aktiven Hengsten bei ungefähr zwei bis drei Tagen, bei inaktiven Hengsten nicht mehr als zehn Tagen (AURICH, 2005).

## **2. Glykohistochemie**

### **2.1. Definition Lektin**

Lektine sind Kohlenhydrat-bindende Proteine oder Glykoproteine nicht immunogenen Ursprungs, die in der Lage sind Zellen zu agglutinieren und/oder Glykokonjugate zu präzipitieren. Die ursprünglich nur in Pflanzen gefundenen Proteine, kommen ebenfalls in Bakterien und Säugetieren vor (GOLDSTEIN, 1980). Sie zeigen keine enzymatische Aktivität auf ihren Liganden und müssen von Antikörpern und freien Mono- und Oligosacchariden als Sensor- und Transportproteine unterschieden werden (GABIUS et al., 2011).

Der Begriff „Lektin“ (aus dem Lateinischen *legere* = auswählen) wurde aufgrund der Fähigkeit der Zucker-bindenden Proteine, Erythrozyten zu agglutinieren gewählt. Inzwischen wurde die Definition „Lektin“ auf alle Kohlenhydrat-bindende Proteine, die generell die Fähigkeit zur Agglutination besitzen ausgedehnt. Dem zu Folge ist das heute auch verwendete Synonym „Agglutinin“ treffender, da es die Fähigkeit beschreibt nicht nur Erythrozyten, sondern auch andere Zellen zu agglutinieren (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

In dieser Arbeit wurden nur Pflanzenlektine verwendet. Im Folgenden liegt deshalb der Schwerpunkt auf dieser Gruppe.

### **2.2. Struktur und Zuckerbindungseigenschaften der Lektine**

Strukturell können die Lektine in Einketten- und Zweikettenlektine unterteilt werden. Die Einkettenlektine sind aus vier nahezu gleichartigen Untereinheiten zusammengesetzt. Hierzu gehört zum Beispiel das Lektin Con A aus der Schwertbohne, das an Glukose- und Mannosereste bindet und aus vier Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 25000 Dalton aufgebaut ist. Insgesamt beträgt das Molekulargewicht von Con A somit 100000 Dalton. Die Lektine dieser Gruppe weisen eine unterschiedliche Zuckerspezifität auf. Die Zweikettenlektine sind aus zwei verschiedenartigen Ketten, einer kleineren  $\alpha$ - und einer größeren  $\beta$ -Kette aufgebaut. Diese kombinieren sich paarweise zu tetrameren Molekülen. Sie kommen in wirtschaftlich wichtigen Pflanzen wie der Erbse, Linse, Saubohne, Futter- oder Gartenwicke vor. Die Lektine aus dieser Gruppe haben alle die gleiche Zuckerspezifität. Sie binden Mannose und Glukose sowie deren  $\alpha$ -Glykoside (RÜDIGER, 1981). Das Molekulargewicht der

Zweikettenlektine als tetramere Struktur ( $\alpha_2\beta_2$ ) beträgt insgesamt 40000 - 50000 Dalton, wobei eine  $\alpha$ -Kette 5000 - 7000 und eine  $\beta$ -Kette 14000 - 20000 Dalton wiegt. (RÜDIGER, 1982).

Die Zucker-bindende Stelle der Lektine beherbergt von einigen Besonderheiten wie dem Helix promatia Lektin abgesehen, meist mehrere komplexe Strukturen von Disacchariden (wie bei dem Lektin aus der Erdnuss) bis zu Tetrasacchariden (wie bei dem Weizenkeim-Lektin). Die Bindung eines Lektins scheint nicht nur allein von der Interaktion mit dem Glykan abhängig zu sein. Zusätzlich können auch nicht polare Reste durch hydrophobe Wechselwirkungen und anionischen Gruppen sowie durch elektrostatische Wechselwirkungen beteiligt sein. Das Letztere ist der Grund warum die succinylierte Form des Lektins aus dem Weizenkeim gegenüber dem mit hohem isoelektrischen Punkt bevorzugt wird (ROTH, 2011).

Die Einteilung der Lektine in zwei Gruppen aufgrund ihrer spezifischen Affinität zu verschiedenen Kohlenhydraten wurde 1984 von Gallagher entwickelt. Bei den "class I lectins" handelt es sich um Lektine, die durch einfache Monosaccharide gehemmt werden. Sie werden als Exolektine bezeichnet. Obligatorische Exolektine sind Lektine, die sich nur an endständige Kohlenhydrate anlagern, fakultative Exolektine können sich dagegen auch an terminale Kohlenhydrate binden. Die "class II lectins" werden auch als Endolektine bezeichnet und können nur durch spezifische Kohlenhydratsequenzen (Oligosaccharide) gehemmt werden. Handelt es sich dabei um gleichartige Sequenzen spricht man von einem homotypischen Endolektin, sind die Kohlenhydratsequenzen dagegen verschiedenartig wird das Endolektin als heterotypisch bezeichnet (GALLAGHER, 1984).

Tabelle 1 Beispiele für Lektine in der Einteilung nach Gallagher

<b>Klasse I: Exolektine</b>	obligat	SBA
		PNA
		UEA I
	fakultativ	Con A
		RCA
<b>Klasse II. Endolektine</b>	homotypisch	STA
	heterotypisch	SJA

1998 beschrieb van Damme die Einteilung der Pflanzenlektine aufgrund struktureller und evolutionärer Zusammenhänge in sieben Gruppen. Die Leguminosen-Lektine, die Chitin-bindenden Lektine, die Typ 2 Ribosom-Inaktivierungs-Lektine und die monokoten Mannose-bindenden Lektine bilden die vier Hauptgruppen und beinhalten die Mehrzahl der derzeit bekannten Lektine. Zu diesen vier Familien sind die Jacalin-bindenden Lektine, die Amaranthin Familie und die Cucurbitaceae phloem-Lektine anerkannte Untergruppen (VAN DAMME, 1998).

Die Einteilung der Lektine in Gruppen kann auch anhand ihrer Zuckerspezifität erfolgen (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986). Um diese Spezifität zu bestimmen, wird die jeweilige Lektinlösung mit einer kohlenhydrathaltigen Verdünnungsreihe vermischt. Nach einigen Minuten der Inkubation wird eine Erythrozyten-Suspension hinzugefügt. Der Kehrwert der niedrigsten kohlenhydratreichen Verdünnungsstufe die die Agglutination verhindert, gibt einen groben Aufschluss über die Affinität zwischen spezifischem Zucker und dem getesteten Lektin (RÜDIGER, 1998). Tabelle 2 zeigt ausgewählte Lektine eingeteilt nach ihrer Zuckerspezifität.



Tabelle 2 Einteilung ausgewählter Lektine nach ihrer Zuckerspezifität

Zuckerspezifität	Ursprung	Abkürzung
Mannose/Glukose-bindende Lektine	Canavalia ensiformis	Con A
	Lens culinaris	LCA
	Pisum sativum	PSA
Galaktose-bindende Lektine	Arachis hypogaea	PNA
	Ricinus communis	RCA I und RCA II
	Erythrina cristagalli	ECA
	Viscum album	VAA
N-Acetylgalaktosamin-bindende Lektine	Glycine max	SBA
	Griffonia simplicifolia I	GSA/GSL I
	Saphora japonica	SJA
	Dolichos biflorus	DBA
	Sambucus nigra	SNA
N-Acetylglukosamin-bindende Lektine	Triticum vulgare	WGA
	Ulex europaeus II	UEA II
	Griffonia simplicifolia II	GSA/GSL II
Fukose-bindende Lektine	Ulex europaeus I	UEA I
	Lotus tetragonolobus	LTA
Sialinsäure-bindende Lektine	Limulus polyphemus	LPA
	Limax flavus	LFA
Lektine mit komplexen Kohlenhydratbindungsstellen	Phaseolus vulgaris	PHA-E
		PHA-L
	Maackia amurensis	MAA I

### 2.3. Verwendung der Lektine

Durch ihre natürliche Vielfalt sind Pflanzenlektine vielseitig anwendbar. Sie dienen als nützliches Werkzeug in der Biochemie, Zellbiologie, Medizin und seit kurzem sogar in der Chip-Technologie. Aufgrund ihrer Stabilität und der Tatsache, dass sie meist markiert werden können ohne dass ihre Aktivität Schaden nimmt, werden sie als bevorzugte Instrumente in verschiedenen Untersuchungen eingesetzt. Durch ihre Zuckerspezifität sind strukturelle Analysen und Trennungen von Gemischen aus Mehrfachzuckern möglich. Dadurch werden krankhafte Veränderungen des Glykophenotyps von Zellen leicht aufdeckbar. Eine der häufigsten Anwendungen in der Immunologie bleibt die Stimulation der Mitose in Lymphozyten, welche schon 1959 zufällig durch Peter C. Nowell entdeckt wurde. Diese zelluläre Aktivität und die Einleitung der Freisetzung von Botenstoffen ebenso wie entzündungsfördernden Zytokinen, stärken die Vermutung eines therapeutischen Potentials der Pflanzenlektine. Diese Annahme konnte aber bis jetzt nicht bestätigt werden (GABIUS & RÜDIGER, 2009).

Die Erforschung der Blutgruppentypisierung und den immer noch allgemein verbreiteten Einsatz der Lektine zur Bestimmung der Blutgruppen beschreiben Sharon und Lis (2004). Durch die selektive Agglutination bestimmter Lektine mit den Erythrozyten verschiedener Blutgruppen erwiesen sich die Lektine als nützlich zur Blutgruppenbestimmung. LBA aus der Limabohne agglutiniert beispielsweise mit den Erythrozyten aus der Blutgruppe A, jedoch nicht mit denen aus Gruppe B und 0 (SHARON & LIS, 2004).

Lektine finden ebenfalls Anwendung in der Tumordiagnostik. Die biochemische Analyse von Lektinen mit verschiedenen Spezifitäten zeigt Unterschiede im Lektinprofil zwischen Tumoren unterschiedlicher Klassen (zum Beispiel Mamma-Adenokarzinome, Rhabdomyosarkome oder Teratome) und Tumoren der gleichen Klasse (zum Beispiel testikuläre Keimzelltumore) sowie Unterschiede in Bezug auf normales Gewebe auf. Die Präsenz endogener Lektine in Tumoren, deren Beziehung zu den Lektinen aus normalem Gewebe und ihre Interaktion mit Glykokonjugaten von Lektinen in Tumoren und normalem Gewebe könnte zum Verständnis der interzellulären Interaktionen während der Metastasierung beitragen und zur Einführung eines neuen Instruments zur Diagnose und Lektin-basierten Therapie führen (GABIUS et al., 1986).

Weit verbreitet ist der Einsatz der Lektine zur Charakterisierung und Isolierung

von Glykokonjugaten. So hat die Lektinhistochemie wesentlich zur Kenntnis von Membranstrukturen, zur Charakterisierung bestimmter Zelltypen und zur Veränderung des Glykokonjugatspektrums beim Malignisierungsprozess beigetragen (FRANZ, 1990).

Zur Differenzierung von Leishmanien (SCHOTTELIUS & DA COSTA, 1982) und Trypanosomen (SCHOTTELIUS, 1982) werden Lektine ebenfalls eingesetzt.

#### **2.4. Lektinbindungsstellen im Nebenhoden**

Es liegen Arbeiten über Lektinbindungsstellen im Hoden und Nebenhoden von verschiedenen Spezies vor. Darunter sind Arbeiten über die Ratte (ARYA & VANHA-PERTTULA, 1984), die Maus (LOHR et al., 2010), Gerbil, Meerschweinchen, Biberratte (ARYA & VANHA-PERTTULA, 1986), die Katze (PREM, 1992), den Hund (SCHICK, 2006; PHILIPP, 2011), das Pferd (KUHRAU, 1994; PARILLO et al., 1997, 1998), das Rind (ARYA & VANHA-PERTTULA, 1985; RAUSCHER, 1991) und den Menschen (ARENAS et al., 1996).

Im Nebenhoden der Maus wurden unter anderem die Lektine PNA, RCA, SBA, Con A, WGA, UEA I, DBA, PHA-E und -L, VAA, SNA, DBA, JAC, MAA I und CD22 untersucht (ARYA & VANHA-PERTTULA, 1986; LOHR et al., 2010). Während PHA-E in allen Abschnitten des Nebenhodens verschieden starke Reaktionen hervorruft, reagieren mit PHA-L nur die Stereozilien in den Ductuli efferentes stark und in der Cauda epididymidis undeutlich schwach positiv. Keine Reaktion zeigen die Ductuli efferentes bei den Untersuchungen mit VAA, SNA und JAC. Der restliche Nebenhoden reagiert mit VAA und SNA in allen Abschnitten, mit JAC zeigen sich hauptsächlich die Stereozilien im Corpus und der Cauda epididymidis. Auch bei den Lektinen CD22, MAA und DBA sind in allen Nebenhodenabschnitten der Maus unterschiedliche Reaktionen zu erkennen (LOHR et al., 2010).

Im Nebenhoden der Katze sind vor allem bei den Untersuchungen mit WGA und Con A stark positive Reaktionen in allen fünf Nebenhodenabschnitten zu erkennen. Während die Basalzellen sonst nur schwach mit BPA (in Abschnitt III bis V) und GSL II (in Abschnitt III und IV) reagieren, zeigen die Hauptzellen mit allen getesteten Lektinen eine Reaktion (PREM, 1992).

Im Nebenhoden des Hundes wurden bei allen Lektinen positive Ergebnisse beobachtet. Während sich bei den Ductuli efferentes meist der apikale Epithelbereich deutlich bis stark positiv darstellt, reagieren im Ductus epididymidis die Hauptzellen und oft auch das Lumen positiv. Die Basalzellen zeigen hier nur bei der Untersuchung mit Con A eine stark positive, mit PSA und PHA-E eine zum Teil deutlich positive und mit PHA-L eine schwach positive Reaktion (SCHICK, 2006).

Im Nebenhoden des Rindes, der in dieser Arbeit in sechs Abschnitte unterteilt wurde, forschte man mit den Lektinen PNA, RCA I, SBA, Con A, WGA, UEA I und DBA. In Region I reagieren die Epitheloberfläche stark und die Hauptzellen unregelmäßig positiv. In Region II und III zeigt sich die apikal gelegene Golgi-Zone stark positiv, welche in Region IV und V subapikal liegt und ebenfalls mit den meisten Lektinen stark positiv reagiert. In Region VI färbt sich die apikale Golgi-Zone schwach an. Bei geschlechtsreifen Tieren ist eine steigende Anzahl an Epithelzellen mit starker Affinität zu bestimmten Lektinen in Region II bis VI positiv gefärbt (ARYA & VANHA-PERTTULA, 1985). Bei den Untersuchungen von Rauscher (1991) zeigen sich die Basalzellen und die Hauptzellen mit Con A positiv (ihre Stereozilien in Region I bis III sogar stark positiv) in allen Abschnitten des Nebenhodens. Auf DBA reagieren der basale Bereich der Hauptzellen und die Basalzellen nicht, die Stereozilien, der apikale Bereich und der Golgi-Apparat der Hauptzellen in Region I-III schwach bis stark positiv. Die Stereozilien der Hauptzellen reagieren in allen Abschnitten des Nebenhodens, jedoch unterschiedlich stark mit dem Lektin GSL I. Der apikale Bereich und der Golgi-Apparat zeigen sich in Region I stark, in Region II deutlich und in Region III nur mehr schwach positiv. Die Reaktion mit MPA fällt nur bei den Basalzellen in allen Abschnitten positiv aus. Während die Stereozilien der Hauptzellen in den verschiedenen Regionen unterschiedlich stark reagieren, zeigt sich der apikale Bereich nur in Region IV bis VI schwach bis deutlich positiv, der basale Bereich ist negativ bis schwach positiv und der Golgi-Apparat negativ auf dieses Lektin. Während WGA in nahezu allen Regionen sowohl bei Basalzellen als auch bei Hauptzellen positive Reaktionen hervorruft, zeigen die Untersuchungen mit PNA UEA I und GSL II keine positiven Färbungen (RAUSCHER, 1991).

Im Nebenhoden des Pferdes wurden in den Ductuli efferentes stark positive Reaktionen mit Con A, SBA und DBA, deutlich positive Reaktionen mit WGA, PNA, RCA, UEA I und LTA und schwach positive Reaktionen mit LCA nachgewiesen (PARILLO et al., 1998). Bei den Untersuchungen von Kuhrau (1994) zeigt sich Con A, genauso wie WGA, DBA und MPA in den Ductuli efferentes stark positiv. Deutlich positiv reagieren hier BPA, PNA und SBA. Keine Reaktionen im Epithel der Ductuli efferentes lösen UEA I, GSL I und II aus (KUHRAU, 1994). Im Caput epididymidis reagiert die Glykokalix stark positiv bei den Untersuchungen mit LCA, WGA, GSL II, SBA, PNA, RCA und DBA. Deutlich positiv zeigt sie sich mit UEA I und LTA. Das Zytoplasma reagiert im Caput mit PNA negativ, ansonsten mit allen untersuchten Lektinen schwach bis deutlich positiv (PARILLO et al., 1997). In entsprechenden Abschnitten reagieren Epithelzellen bei Kuhrau (1994) mit Con A, GSL I und UEA I stark positiv, bei den Untersuchungen mit DBA, WGA und MPA deutlich positiv und schwach positiv mit BPA, SBA und GSL II. In den Abschnitten die im Corpus epididymidis liegen, zeigen sich die Epithelzellen stark positiv bei den Lektinen Con A, MPA, PNA und WGA und schwach positiv bei BPA und DPA (KUHRAU, 1994). Bei den Untersuchungen von Parillo (1997) im Corpus epididymidis ist die Glykokalix deutlich positiv und das Zytoplasma schwach positiv mit den Lektinen Con A und LCA. Die Golgi-Zone zeigt hier eine deutlich positive Reaktion mit WGA, PNA und UEA I. Die Cauda epididymidis weist Bindungsstellen mit Con A, LCA, PNA, DBA, UEA I und LTA in der Glykokalix und mit Con A, LCA und PNA auch im Zytoplasma auf (PARILLO et al., 1997). Kuhrau (1994) weist in Segment VI, das der Cauda epididymidis entspricht, unterschiedlich positive Reaktionen in den Epithelzellen bei den Untersuchungen mit den Lektinen BPA, Con A, GSL I, MPA, PNA und WGA nach.

### **3. Immunhistochemie**

#### **3.1. Das Zytoskelett**

Alle Zellen von Eukaryonten werden von dem Zytoskelett durchzogen. Dieses feinfädige Netzwerk spielt unter anderem bei dem Erhalt der Zellform, bei Transportprozessen im Zytoplasma, bei Bewegungsvorgängen der Zelle und bei der Zellteilung eine wichtige Rolle. Es lassen sich chemisch und morphologisch die Mikrotubuli, die Mikrofilamente und die Intermediärfilamente als verschiedene Komponenten unterscheiden.

Die Mikrotubuli bestimmen häufig die subzelluläre Struktur des Zytoplasmas, wirken bei intrazellulären Transportvorgängen mit und spielen selbst bei der Zellbewegung eine indirekte Rolle. Ihre Wand besteht hauptsächlich aus Molekülen des globulären Proteins Tubulin.

Die Mikrofilamente (Aktinfilamente) sind feine, einzeln oder in Bündeln auftretende fädige Strukturen, die 10 - 15 % des Gesamtproteins einer Zelle ausmachen. Sie bestehen aus kugelförmigen Aktin-G-Molekülen, die sich schnell zu langen Aktin-F-Fasern aneinander lagern, als auch wieder trennen können. Man unterscheidet Aktinfilamente, die regelmäßig mit Myosin assoziieren und somit in der Lage sind sich zu kontrahieren, von solchen die mit wenig oder ohne gebundenem Myosin auftreten. Aktin-Myosin-Komplexe bilden in der quergestreiften Muskulatur die Myofibrillen. Während die Aktinfilamente hier außerordentlich regelmäßig angeordnet sind, kommen sie in anderen Zellarten zwar ebenfalls als Aktin-Myosin-Komplex, aber weniger exakt angeordnet vor. Aktinfilamente, die nicht mit Myosin in Verbindung stehen, liegen bei den meisten Zellen als dünne Schicht direkt unter der Zellmembran. Sie sollen bei der Endo- und Exozytose sowie der Kontraktion der Mikrovilli eine Rolle spielen (HEES & SINOWATZ, 2000).

Die Intermediärfilamente werden aufgrund ihres Durchmessers von 8 – 10 nm, der zwischen jenem der Mikrofilamente und der Mikrotubuli liegt so bezeichnet. Sie bestehen aus Polypeptidketten und sind die am wenigsten löslichen Bestandteile des Zytosols. Ihre Anordnung im Zytoplasma ist meist parallel und sie verlaufen entlang zytoplasmatischen Zug- und Drucklinien. So geben sie der Zelle eine hohe Stabilität. Im Gegensatz zu Aktinfilamenten und Mikrotubuli

lösen sich die Intermediärfilamente nicht auf oder bilden sich neu, sondern stellen wesentliche permanente stabile Strukturelemente einer Zelle dar (LIEBICH, 2004).

Die in über 67 Genen codierten Intermediärfilamente (HESSE et al., 2001) werden mit biochemischen und immunzytochemischen Methoden in fünf Klassen unterteilt (HEES & SINOWATZ, 2000).

Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verschiedenen Klassen der Intermediärfilamente (PALLARI & ERIKSSON, 2006)

Tabelle 3 Klassen der Intermediärfilamente

Klasse	Protein	Vorkommen
Klasse I	Saure Keratine (K9-20)	Epithelzellen
Klasse II	Basische Keratine (K1-8)	Epithelzellen
Klasse III	Vimentin Desmin Glial Fibrillary Acidin Protein (GFAP)	Mesenchymale Zellen Muskelzellen Astrozyten, andere Gliazellen
Klasse IV	NF-L NF-M NF-H Nestin Synemin	ZNS-Nervenzellen ZNS-Nervenzellen ZNS-Nervenzellen Neuroepitheliale Stammzellen, Myoblasten Muskelzellen, ZNS-Entwicklung
Klasse V	Lamin A/C Lamin B1 Lamin B2	Differenzierte Zellen Alle Zelltypen Alle Zelltypen

Die in der Tabelle aufgeführte Einteilung der Zytokeratine (Keratine) in zwei Gruppen, die der sauren und der basisch bis neutralen Keratine erfolgte im Jahr 1982 (MOLL et al., 1982). Die systematische Sequenzierung des menschlichen Genoms deckte immer mehr Keratin-Gene und ihre codierten Proteine auf. Ihre Benennung konnte nicht problemlos in das bereits vorhandene System eingegliedert werden, sodass eine neue Nomenklatur nötig wurde. Diese baut auf dem „Moll-System“ auf und unterteilt jeden der beiden Keratin-Typen weiter in vier Gruppen: 1. Epitheliale Keratine/Gene des Menschen, 2. Haar-Keratine/Gene des Menschen, 3. Keratine anderer Säugetiere und 4. Keratine-Pseudogene des Menschen (SCHWEIZER et al., 2006).

Anfangs ging man davon aus, dass die Intermediärfilamente eine rein statische Stützfunktion des Zytoskeletts einnehmen. Inzwischen weiß man, dass diese Proteine auf die gleiche Art wie andere Bestandteile des Zytoskeletts, hochdynamische Strukturen formen. Ausserdem haben Untersuchungen ergeben, dass eine Vielzahl von Krankheiten mit der Mutation von Intermediärfilament-Genen und damit der eingeschränkten Funktion der Proteine in Zusammenhang zu bringen sind. Folglich geht man davon aus, dass sie auch Gerüst für Signalmoleküle in Signalkaskaden sind und diese beeinflussen. Die Interaktion mit Stress-induzierten Kinasen macht sie ebenfalls sehr gefragt für den Schutz gegenüber zellulärem Stress. Hier wirken die Intermediärfilamente als Phosphat-Puffer in den gestressten Zellen. Da man davon ausgeht, dass es noch viele unentdeckte Funktionen der Intermediärfilamente gibt, scheint es möglich zu sein, dass sie für eine sehr breite Spanne von Signalkaskaden, welche sowohl wichtig für die normale Homeostase als auch für Entwicklungs- und Stress-betreffende Prozesse zuständig sind (ERIKSSON et al., 2009).

In der pathohistologischen Diagnostik spielen die Intermediärfilamente eine wichtige Rolle. Sie dienen als Marker für bestimmte Gewebe und lassen so bei enddifferenzierten Tumoren oder Metastasen wichtige Rückschlüsse auf die Zellart des Ausgangsgewebes gewinnen (HEES & SINOWATZ, 2000).



### 3.2. Laminin

Das Laminin ist ein nicht-kollagenhaltiges Glykoprotein, das einen Hauptbestandteil der Basalmembran bildet (ROHDE et al., 1979; TIMPL et al., 1979). Es besteht aus Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. So entsteht eine unsymmetrische Kreuz-Struktur aus drei Polypeptid-Armen und einem vierten langen, flexiblen Arm (ENGEL et al., 1981; BECK et al., 1990; MECHAM, 1991). An diesen Armen sind unterschiedliche funktionelle Bereiche, die für die Interaktion mit den Oberflächenrezeptoren der Zelle verantwortlich sind. Viele dieser Stellen existieren jeweils nur auf einem bestimmten Arm des Laminins, während andere auf allen drei Armen zu sein scheinen. So binden verschieden Proteine an das Laminin. Dazu zählen sowohl integrierte Rezeptoren, als auch nicht-integrierte Proteine, glykosilierte Enzyme, Galaktose-bindende Lektine, an eine Sulfatgruppe gekoppelte Polysaccharide und Glykolipide, sowie aus Bakterien stammende Proteine. Durch diese Bindungsstellen kann das Laminin zelluläre Verbindungen, Bewegung, Differenzierung und Wachstum der Zelle beeinflussen (MECHAM, 1991).

Es wurden bereits Untersuchungen vom Nebenhoden des Menschen (PALACIOS et al., 1993), von Geflügel und Kaninchen (ABD-ELMAKSoud, 2009), von Hund (SCHICK, 2006) und Katze (RUFF, 2005) mit Laminin durchgeführt. Hier war beim Mensch die Basalmembran der Ductuli efferentes und aller drei Nebenhodenabschnitte sowie die der Blutgefäße positiv (PALACIOS et al., 1993). Eine deutlich positive Reaktion zeigte die Basalmembran des Nebenhodens bei Huhn, Ente und Taube, weniger positive Abschnitte waren bei der Basalmembran des Kaninchens zu erkennen. Schwach bis mäßig positiv reagierte die apikale Oberfläche von Zilien-tragenden Zellen der proximalen und distalen Ductuli efferentes bei Huhn, Ente und Taube. Laminin-positiv waren die epididymalen Gefäße von allen Vögeln und dem Kaninchen (ABD-ELMAKSoud, 2009). Bei der Katze und dem Hund zeigte die Basalmembran der Ductuli efferentes eine stark positive Reaktion und das Zytoplasma der subapikalen Zilienzellen in diesem Bereich färbte sich unspezifisch an. Zudem reagierte die Basalmembran aller Nebenhodenabschnitte, die der im Bindegewebe liegenden Gefäße und der glatten Muskulatur durchgängig stark positiv (RUFF, 2005; SCHICK, 2006).

### 3.3. Cyclooxygenase (COX) I

Die Cyclooxygenase ist ein wichtiges Enzym der Prostaglandinsynthese, bei der sie für die oxidative Cyclisierung ungesättigter Fettsäuren aus der Arachidonsäurekaskade durch ihre enzymatische Aktivität verantwortlich ist (KIETZMANN et al., 2002). Die Arachidonsäure (AA) wird über zwei Schritte durch die Prostaglandin-Synthase (Cyclooxygenase und Endoperoxidase) zu Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) und anschließend zu Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Aus PGH<sub>2</sub> wird durch die zuständige Isomerase die Prostaglandine PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  und PGD<sub>2</sub>, Prostacycline und Thromboxane gebildet (HERSCHMAN, 1996; KREUTZIG, 2002). Man unterscheidet zwei Isoformen, die Cyclooxygenase I (COX I) und die Cyclooxygenase II (COX II). Während COX I in nahezu allen Zelltypen vorkommt, wird COX II nur in entzündlich stimulierten Zellen beobachtet (VANE, 1994).

Im Nebenhoden wird der Wasser- und Elektrolyttransport von den Basalzellen zu den Hauptzellen durch einige Peptidhormone wie den Angiotensinen, dem Vasopressin, dem Endothelin und den Bradykininen beeinflusst. Diese binden zuerst an Rezeptoren der Basalzellen wodurch es zur Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) kommt. Dadurch wird AA aus Membranphospholipiden (MPL) frei und das hier vorkommende COX I wirkt als Enzym zur Synthese von PGE<sub>2</sub>. Das PGE<sub>2</sub> diffundiert daraufhin ins Interstitium und bindet an die Prostaglandin-Rezeptoren Subtyp EP 2/4 der basolateralen Membran der Hauptzellen. Dies sorgt für einen intrazellulären Anstieg des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) und es kommt zu einer Aktivierung der apikal liegenden CFTR-Kanäle (cystic-fibrosis transmembran conductance regulator) und somit zur Sekretion von Anionen und sekundär von Wasser ins Lumen (LEUNG et al., 2004). Dies zeigt wie wichtig die Basalzellen für die Regulation des epididymalen Flüssigkeitsmilieus im Lumen sind (CHEUNG et al., 2005). Untersuchungen am Nebenhoden mit COX I haben bei der Ratte positive Ergebnisse ausschließlich in den Basalzellen aller drei Nebenhodenabschnitten ergeben (LEUNG et al., 2004). Beim Hund zeigte das apikale Zytoplasma der Epithelzellen der Ductuli efferentes eine positive COX I-Reaktion. Die Basalzellen der übrigen drei Nebenhodenabschnitte waren nur schwach positiv. Jedoch zeigten die weiter außen gelegenen glatten Muskelzellen in der Cauda eine deutlich positive perinukleäre Reaktion (PHILIPP, 2011).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden die Nebenhoden von 20 Pferden (*Equus ferus caballus*) herangezogen. Diese wurden in der kurativen Praxis kastriert und waren klinisch gesund. Sowohl Hoden als auch Nebenhoden waren makroskopisch unverändert. Die Tiere waren zwischen einem und sechs Jahre alt und von unterschiedlicher Rasse. Tabelle 4 liefert eine kurze Übersicht über die verwendeten Tiere.

Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Tiere

Nr.	Rasse	Alter	Blocknummer
1	Vollblut	2 Jahre	488/10 - 495/10 und 504/10 - 511/10
2	Haflinger	1,5 Jahre	496/10 - 503/10 und 512/10 - 519/10
3	Quarter Horse	1,5 Jahre	639/10 - 654/10
4	Süddeutsches Kaltblut	3 Jahre	655/10 - 670/10
5	Süddeutsches Kaltblut	3 Jahre	671/10 - 686/10
6	Süddeutsches Kaltblut	6 Jahre	687/10 - 702/10
7	Süddeutsches Kaltblut	3 Jahre	703/10 - 718/10
8	Süddeutsches Kaltblut	2 Jahre	719/10 - 726/10
9	Süddeutsches Kaltblut	1 Jahr	727/10 - 734/10
10	Süddeutsches Kaltblut	2 Jahre	735/10 - 742/10
11	Süddeutsches Kaltblut	2 Jahre	743/10 - 750/10
12	Süddeutsches Kaltblut	2 Jahre	751/10 - 758/10
13	Warmblut (Hannoveraner)	3 Jahre	759/10 - 766/10
14	Warmblut (Hannoveraner)	3 Jahre	767/10 - 774/10
15	Warmblut (Oldenburger)	2 Jahre	775/10 - 782/10
16	Warmblut (Bayer)	3 Jahre	783/10 - 790/10
17	Warmblut (Bayer)	2 Jahre	791/10 - 798/10
18	Warmblut (Oldenburger)	3 Jahre	799/10 - 806/10
19	Quarter Horse	2 Jahre	807/10 - 820/10
20	Haflinger	3 Jahre	821/10 - 834/10

## **2. Probenentnahme und Fixierung**

### **2.1. Probenentnahme**

Unmittelbar nach dem Absetzen der Hoden und Nebenhoden wurden diese vollständig voneinander getrennt. Anschließend wurden die Nebenhoden in ihre Abschnitte Ductuli efferentes, Initial-, Mittel- und Terminalsegment unterteilt und mit einer scharfen sterilen Rasierklinge präpariert.

#### **2.1.1. Fixierung für lichtmikroskopische Untersuchungen**

Als Fixans für die Lichtmikroskopie (konventionelle routinehistologische Färbungen, Immun- und Glykohistochemie) wurden zwei unterschiedliche Lösungen verwendet. Von jedem Nebenhodenabschnitt jeden Tieres ist sowohl ein Teilstück in Bouin'scher Lösung als auch in 4 % gepuffertem Formalin fixiert worden (ROMEIS, 2010).

Fixierung in Bouin'scher Lösung:

Die Proben wurden für 24 Stunden bei Zimmertemperatur in Bouin'scher Lösung (gesättigte Pikrinsäure: Formalin: Eisessig wie 15 : 5 : 1) fixiert und anschließend im Abstand von 24 Stunden dreimal in 70%igen Alkohol verbracht, um das Fixierungsmittel wieder auszuwaschen.

Fixierung in Formalin:

Die Proben wurden bei Zimmertemperatur und auf dem Rüttler für 2 - 4 Tage (je nach Wochentag der Probenentnahme) in Formalin fixiert. Dieses wurde wenige Stunden nach der Probenentnahme und folgend nach jeweils 24 Stunden gewechselt. Vor der Weiterbehandlung wurden die Proben mit demineralisiertem Wasser und anschließend in 70%igem Alkohol (jeweils dreimaliges Wechseln innerhalb von zwei Stunden) entwässert.

Anschließend wurden sowohl die in Formalin fixierten, als auch die in Bouin'scher Lösung fixierten Proben mittels eines Einbettungsautomaten (Shandon Duplex Processor der Firma Shandon, Frankfurt) in einer aufsteigenden Alkoholreihe über 24 Stunden dehydriert und mit flüssigem Paraplast (Monoject Scientific Inc. Kildare, Irland) durchtränkt. Die so präparierten Proben wurden dann mit Hilfe einer Paraffinausgießstation (Histostat Tissue Embedding Center der Firma Reichert-Jung, Wien) in kleine quadratische Paraplastschalen mit

Rahmen gegossen. Diese standen anschließend zum Auskühlen für eine Stunde auf einer Kühlplatte. Von jedem der so entstandenen Blöcke wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Firma Leitz, Typ 1516) 5 µm dicke Schnitte angefertigt und sowohl auf beschichtete (SupraFrostUltraPlus®adhäsiv) als auch auf unbeschichtete (SuperFrost®) Objektträger (beide Firma Menzel-Gläser, Braunschweig) gezogen. Sie wurden auf einem Wärmestrecktisch getrocknet und bis zur vollständigen Trocknung mindestens 24 Stunden in einem Wärmeschränk bei 30 - 40 °C aufbewahrt.

Die Schnitte sind für die konventionellen, immunhistochemischen und glykohistochemischen Färbungen verwendet worden.

### **2.1.2. Fixierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen**

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Nebenhoden von 13 Pferden verwendet. Es wurden Teile von einem Durchmesser von 1 mm aus Ductuli efferentes, Initial-, Mittel- und Terminalsegment des Ductus epididymidis steril entnommen und sofort in Karnovsky-Lösung (2 % Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer, pH-Wert 7,2) fixiert. Über Nacht blieben die Proben bei 4 °C im Kühlschränk um dann die Karnovsky-Lösung abpipettieren und die Proben in Eppendorf-Gefäße mit Cacodylat-Puffer (0,1M, pH-Wert 7,4) zu verbringen. Der Cacodylat-Puffer wurde mehrfach gewechselt und die Proben daraufhin in 1,5%igem Kaliumferrocyanid und 1%igem Osmiumtetroxid für zwei Stunden im Dunkeln bei 4 °C kontrastiert. Es folgte das dreimalige Waschen in 0,1 M Cacodylat-Puffer und die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Danach wurden die Proben schrittweise in Polyembed eingebettet. Dazu wurden sie zweimal 15 Minuten in Propylenoxid (Merck, Darmstadt) eine Stunde in Propylenoxid-Polyembed-Gemisch (2 : 1), über Nacht in Propylenoxid-Polyembed-Gemisch (1 : 1) und schließlich eine Stunde in Polyembed auf dem Rüttler verbracht. Anschließend erfolgt eine Kunstharzeinbettung in spezielle Flacheinbettungsformen (Polysciences, Warrington, USA). Nach mindestens 24 Stunden zur Polymerisation bei 60 °C im Wärmeschränk wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte an einem Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) angefertigt. Zur Übersicht wurden die Schnitte mit Methylenblau nach Richardson gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. So wurden die passenden Areale für die Anfertigung von Ultradünnschnitten (Schnittdicke 40 - 60 nm) ausgewählt. Die Anfertigung der

---

Ultradünnschnitte erfolgte ebenfalls am Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien). Die Schnitte wurden zum Abschluss auf Kupfergrids gezogen und mit gesättigtem 2%igem Uranylacetat und Bleicitratlösung (REYNOLDS, 1963) nachkontrastiert.

### **3. Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen**

Für die verschiedenen Übersichtsfärbungen wurden alle Schnitte zunächst mit Xylol zweimal zehn Minuten entparaffiniert, über eine absteigende Alkoholreihe bis hin zum Aqua dest. rehydriert, anschließend gefärbt und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit einem Tropfen Eukitt® (Riedel de Haen AG, Seelze) eingedeckelt.

Die Methoden der einzelnen, nach Romeis (2010) durchgeführten Färbungen sind im Anschluss aufgeführt.

#### **3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)**

Bei dieser Übersichtsfärbung stellen sich die Kerne blauviolett und das restliche Gewebe rosarot dar.

Nach der Alkoholreihe wurden die Schnitte für die Kernfärbung 20 Minuten in Hämalan belassen, kurz in Aqua dest. geschwenkt und anschließend 20 Minuten zum Bläuen unter fließendem Leitungswasser gespült. Dann wurden die Schnitte für zehn Minuten in Eosin verbracht. Abschließend erfolgte die aufsteigende Alkoholreihe.

#### **3.2. Trichromfärbung nach Masson-Goldner**

Bei dieser Färbung erscheinen die Kerne durch das Eisenhämatoxylin nach Weigert braunschwarz und das Zytoplasma ziegelrot. Erythrozyten färben sich orange-gelb an. Die kollagenen Bindegewebsfasern werden in grün besonders dargestellt.

Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für eine Minute in Eisenhämatoxylin nach Weigert verbracht und anschließend unter fließendem Leitungswasser zehn Minuten gespült. Dann wurden sie für fünf Minuten in Azophloxin belassen. Im Folgenden wurden die Schnitte mit 1%iger Essigsäure und Aqua dest. gut gespült und 30 Sekunden in Phosphormolybdänsäure-Orange gelassen, bevor nach einer weiterer Spülung mit 1%iger Essigsäure eine Gegenfärbung mit Lichtgrün durchgeführt wurde (fünf Minuten). Nach abschließendem Spülen mit 1%iger Essigsäure erfolgte die aufsteigende Alkoholreihe.

### **3.3. Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus (PAS-Reaktion)**

Diese Färbung dient dem Nachweis von Aldehydgruppen, die durch die Oxidation von Glykogen mit Perjodsäure entstehen. Somit lassen sich kohlenhydratreiche Makromoleküle (Glykoproteine, Glykogen, Glykolipide und Mucopolysaccharide) identifizieren. Die Aldehydgruppen bilden mit dem Schiff-Reagenz einen purpurroten Farbkomplex. PAS-positive Substanzen färben sich also rosa bis violett an.

Die Schnitte wurden nach der absteigenden Alkoholreihe für fünf Minuten in eine 0,5%ige Lösung von Perjodsäure und nach anschließendem Spülen in Aqua dest. für 15 Minuten in Schiff'sches Reagenz verbracht. Nach Waschen in Schwefeldioxid-Wasser und fließendem Leitungswasser erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun und erneutes Spülen in fließendem Leitungswasser. Abschließend durchlaufen die Schnitte die aufsteigende Alkoholreihe.

#### **3.3.1. PAS-Reaktion mit Amylaseverdau**

Eine PAS-Reaktion mit Amylaseverdau wird durchgeführt, um Glykogen zu identifizieren. Glykogen wird von Amylase verdaut. Folglich handelt es sich bei den nach dieser Behandlung noch positiv reagierenden Substanzen nicht um Glykogen.

Bei der Färbung mit Amylase wurden nach der absteigenden Alkoholreihe die Schnitte in eine feuchte Kammer verbracht, auf jeden Schnitt 100 µl 0,5%ige Amylase pipettiert und bei Raumtemperatur zwei Stunden belassen. Anschließend wurde mit Aqua dest. gespült und mit der PAS-Reaktion fortgefahren.

#### **3.3.2. PAS-Reaktion mit Acetylierung**

Die Perjodsäure in der PAS-Reaktion oxidiert die freien 1,2-Glykolgruppen zu Aldehydgruppen. Durch vorheriger Acetylierung werden  $\alpha$ -Glykole und  $\alpha$ -Aminoalkohole der oxidativen Wirkung der Perjodsäure entzogen (MISLIN, 1961). Eine vollständige Acetylierung ist schwierig (MICHEEL & UCHTA, 1961).

Bei der PAS-Reaktion mit Acetylierung wurden die Schnitte nach der absteigenden Alkoholreihe für 24 Stunden in Säureanhydrid-Pyridin-Lösung gestellt. Im Anschluss wurden sie zweimal für jeweils zwei Minuten in Aqua dest. gespült und mit der PAS-Reaktion fortgefahren.



### **3.3.3. PAS-Reaktion mit Methylierung**

Durch die im PAS-Reagens vorhandene Perjodsäure werden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidiert. Die Vorbehandlung mit einer Methylierung führt zur Blockierung der Hydroxylgruppen. Eine vollständige Methylierung von Polysacchariden ist unmöglich (MICHEEL & UCHTA, 1961).

Bei vorhergehender Methylierung wurden die Schnitte nach der absteigenden Alkoholreihe für 96 Stunden in 0,1 n-Salzsäure-Methanol (absolut)-Lösung gestellt. Daraufhin folgte die PAS-Reaktion.

### **3.4. Alcianblau-Färbung**

In dieser Färbung stellen sich saure Mukosubstanzen leuchtend blau, die Kerne hellrot und der Hintergrund zartrosa dar. Um zwischen Karboxyl- und Sulfatgruppen differenzieren zu können, wird diese Färbung bei einem pH-Wert von 2,5 und 1,0 durchgeführt. Bei pH 1,0 färben sich nur sulfatierte Mukosubstanzen an, bei pH 2,5 stellen sich zusätzlich karboxylierte Mukosubstanzen dar.

Zur Darstellung saurer Mukosubstanzen wurden die Schnitte in 3%iger Essigsäure verbracht und dann 30 Minuten in Alcianblau (pH-Wert 2,5) gefärbt, mit Aqua dest. gespült und fünf Minuten in Kernechtrot gefärbt. Nach erneutem Spülen erfolgte die aufsteigende Alkoholreihe.

Zur Darstellung sulfatierter Mukosubstanzen wurden die Schnitte vor und nach der Färbung mit Alcianblau in 0,1 N Salzsäure gegeben, anschließend mit Aqua dest. gespült und dann mit Kernechtrot gefärbt.

### **3.5. Sirius Red-Färbung**

Bei der Färbung mit Sirius-Red lassen sich die eosinophilen Granulozyten gezielt darstellen (WEHREND et al., 2004). Sie färben sich leuchtend rot an.

Nach dem Entparaffinieren durch die absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte zehn Minuten in Hämalun belassen. Anschließend wurden sie 15 Minuten zum Bläuen unter fließendem Leitungswasser gespült. Nach kurzen Schwenken in 70%igem Alkohol blieben die Schnitte für eine Stunde in der Sirius-Red-Färbelösung. Es folgte abschließend die aufsteigende Alkoholreihe.

#### Auswertung:

Die lichtmikroskopische Auswertung und Fotodokumentation der konventionell gefärbten Schnitte erfolgte mit einem Mikroskop (Aristoplan®) der Firma Leitz, Wetzlar. Daran war eine Kamera (Lumera USB Camera Release 3.8) der Firma Lumenera Corporations, Ontario, Kanada angeschlossen.

#### **4. Glykohistochemische Färbungen**

Zum Nachweis von Glykokonjugaten im Nebenhoden des Pferdes wurden die in Tabelle 5 und 6 angegebenen Lektine verwendet. Es handelt sich sowohl um mit Biotin konjugierte, als auch um bereits mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) markierte Lektine. Es wurden Bouin-fixierte 5 µm dicke Schnitte benutzt.

Negativkontrolle:

Um mögliche Eigenfluoreszenz des Gewebes zu erkennen, wurden Negativkontrollen des jeweilig zu untersuchenden Präparates angefertigt. Hierbei wurde anstelle der Lektinlösung mit 100 µl PBS-Puffer inkubiert.

Positivkontrolle:

Um das Funktionieren des jeweilig verwendeten Lektins zu überprüfen, wurden Positivkontrollen angefertigt. Hierzu wurde Gewebe bei dem bekannt ist, dass es mit den entsprechenden Lektinen reagiert verwendet.

Auswertung:

Die Auswertung und Fotodokumentation der Präparate der glykohistochemischen Untersuchungen erfolgte an einem Mikroskop (Axiovert 200M®) der Firma Zeiss, Oberkochen. An diesem war eine Kamera (Axiocam ICc 1®) der Firma Zeiss, Oberkochen angeschlossen.

Tabelle 5 Übersicht der verwendeten mit Biotin konjugierten Lektine

Pflanzen- und Lektinname	Abkürzung	Spezifität für Mono-saccharide	Potente Oligosaccharide
<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin (Schwarzer Holunder)	SNA	Gal/ GalNAc	Neu5Ac/Gc $\alpha$ 6Gal/GalNAc (Bindung von Typ I LacNAc Core bevorzugt; 6-Sulfatierung von GlcNAc in $\alpha$ 2,6-sialysierten LacNAc steigert die Affinität), geclustertes Tn-Antigen, 9'-O-Acetylierung wird toleriert
<i>Maackia amurensis</i> Agglutinin-I Leukoagglutinin (Asiatisches Gelbholz)	MAA I	Keine Mono-saccharid-spezifität bekannt	Neu5Ac/Gc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc/ Glc (Bindungsspezifität für Typ II LacNAc Core), 9'-O-Acetylierung wird toleriert, Core reaktiv bei 3-sulfatierten LacNAc
<i>Viscum album</i> Agglutinin (Weißbeerige Mistel)	VAA	Gal	Gal $\beta$ 2(3)Gal, Gal $\alpha$ 3(4)Gal, Fuc $\alpha$ 2Gal, Gal $\beta$ 3(4)GlcNAc mit/ohne $\alpha$ 2,6-Sialisierung

(Modifiziert nach Chokhawala, Gabius, Habermann und Knibbs (KNIBBS et al., 1991; CHOKHAWALA et al., 2008; GABIUS et al., 2011; HABERMANN, 2011))

Gal = Galaktose, GalNAc = N-Acetylgalaktosamin, GlcNAc = N-Acetylglukosamin, LacNAc = N-Acetyllactosamin, Neu5Ac = N-Acetylneuraminsäure, Glc = Glukose, Man = Mannose, Fuc = Fukose

Tabelle 6 Übersicht der verwendeten mit FITC-markierten Lektine

Pflanzen- und Lektinname	Abkürzung	Spezifität für Mono-saccharide	Potente Oligosaccharide
Canavalia ensiformis Agglutinin (Schwertbohne)	Con A	Man/Glc	GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6(GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3)Man $\beta$ 4GlcNAc
Lens culinaris Agglutinin (Linse)	LCA	Man/Glc	Bindung an N-Glykane, verstärkt durch Core-Fukosylierung
Pisum sativum Agglutinin (Gartenbohne)	PSA	Man/Glc	Bindung an N-Glykane, verstärkt durch Core-Fukosylierung
Arachis hypogaea Agglutinin (Erdnuss)	PNA	Gal	Gal $\beta$ 3GalNAc $\alpha$ / $\beta$
Ricinus communis Agglutinin (Wunderbaum)	RCA	Gal	Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 1R
Erythrina cristagalli Agglutinin (Korallenstrauch)	ECA	Gal	Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 6(Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2)Man
Glycine max Agglutinin (Sojabohne)	SBA	GalNAc	GalNAc $\alpha$ 3Gal( $\beta$ 6Glc), Sialidase-vorbehandelte submaxillare Muzine
Griffonia simplicifolia Agglutinin (Schwarzbohne)	GSL I	GalNAc	GalNAc $\alpha$ 3Gal, GalNAc $\alpha$ 3GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc
Saphora japonica Agglutinin (japanischer Schnurbaum)	SJA	GalNAc	GalNAc $\beta$ 6Gal, Gal $\beta$ 3GalNAc

Dolichos biflorus Agglutinin (Pferdebohne)	DBA	GalNAc	GalNAc $\alpha$ 3GalNAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4Gal $\beta$ 4Glc > A-Tetrasaccharide
Triticum vulgare Agglutinin (Weizen)	WGA	GlcNAc/ Neu5Ac	(GlcNAc $\beta$ <sub>4</sub> ) <sub>n</sub> , (Man $\beta$ 4)GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc(1, N-Asn), geclusterte sialysierte Tn/Tn-Antigene in Muzinen, O-GlcNAcetylierung von Proteinen
Triticum vulgare Agglutinin succinyliert (Weizen)	WGAs	(GlcNAc) <sub>2</sub> /NeuNAc	Die Succinylierung von WGA (WGAs) reduziert die Sensitivität der Bindung an Neuraminidase in Zellen
Ulex europaeus Agglutinin (Stechginster)	UEA I	Fuc	Fuc $\alpha$ 2Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 6R
Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (Kidneybohne)	PHA-E	Keine Mono- saccharid- spezifität bekannt	Mit $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 Bindung an zentrale Mannose von komplexen N- Glykanen verknüpfte GlucNAc; Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6(GlcN Ac $\beta$ 2Man $\alpha$ 3)(GlcNAc $\beta$ 4)Man $\beta$ 4GlcNAc
Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (Kidneybohne)	PHA-L	Keine Mono- saccharid- spezifität bekannt	„Tetraantennary“ und triantennary“ N-Glykane mit $\beta$ 6-Verzweigung

(Modifiziert nach Gabius, Habermann, Monsigny und Rüdiger (MONSIGNY et al., 1980; GABIUS & RÜDIGER, 2009; GABIUS et al., 2011; HABERMANN, 2011))

Glc = Glukose, Man = Mannose, Gal = Galaktose, GlcNAc = N-Acetylglukosamin, NeuNAc = Neu5Ac = N-Acetylneuraminsäure, GalNAc = N-Acetylgalaktosamin; Fuc = Fukose

#### 4.1. Färbung mit Biotin konjugierten Lektinen

Die mit Biotin konjugierten Pflanzen-Lektine VAA, MAA I und SNA stammen aus dem Lehrstuhl für Physiologische Chemie, Veterinärwissenschaftliches Department der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Der Glykokonjugat-Nachweis erfolgte hier nach der indirekten Methode bei der der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiozyanat (FITC) an Streptavidin gekoppelt ist. Das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isolierte Streptavidin löst das ursprünglich in der ABC-Methode verwendete Avidin ab. Bei dieser Methode nutzt man die hohe Bindungsaffinität des Avidins bzw. Streptavidins zum Biotin und ihre vier Bindungsstellen. Das biotinylierte Lektin bindet so an eine spezifische Kohlenhydrat-Struktur und die Reaktion wird durch die Bindung des Streptavidin/FITC-Komplexes an das Biotin des Lektins sichtbar.

Es wurde folgendes Protokoll für die Untersuchungen verwendet:

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (zweimal 20 Minuten) und rehydrieren in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest.
- Dreimal 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung, Schnitte in einer feuchten Kammer mit Dako Protein Block Serum Free (Firma Dako, Hamburg) betropfen und danach 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 100 µl PBS gepuffertes biotinyliertes Lektin (Konzentration 5 µg/ml) pro Schnitt auftragen und 1 Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- Dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Schnitte mit Streptavidin/FITC in PBS-Puffer 1 : 500 verdünnt beschichten und 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- Dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Jeden Schnitt einzeln mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol, DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI H 1200,

Vector Laboratories Inc, Burlingame) zur Färbung der Zellkerne bzw. der DNA beschichten

- Die Schnitte sofort mit durchsichtigem Nagellack eindeckeln und abgedunkelt im Kühlschrank aufbewahren.

#### **4.2. Färbung mit FITC markierten Lektinen**

Der Nachweis von Glykokonjugaten mit FITC markierten Lektinen (Firma Vector Laboratories, Burlingame, USA) erfolgte nach der direkten Methode. Dabei bindet das mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC konjugierte Lektin direkt an den spezifischen Zucker.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (zweimal 20 Minuten) und rehydrieren in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest.
- Dreimal je 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- 100 µl gepuffertes Lektin (Konzentration 5 µg/ml) pro Schnitt auftragen und bei Raumtemperatur für 1 Stunde in einer feuchten Kammer inkubieren
- Dreimal je 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Jeden Schnitt einzeln mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol, DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI H 1200, Vector Laboratories Inc, Burlingame) zur Färbung der Zellkerne bzw. der DNA beschichten
- Die Schnitte sofort mit durchsichtigem Nagellack eindeckeln und abgedunkelt im Kühlschrank aufbewahren.



## **5. Immunhistochemische Färbungen**

Bei diesen Untersuchungen wurde nach der indirekten Immunmarkierung mit Signalverstärkung durch die oben bereits beschriebene ABC-Methode vorgegangen. Hierbei wird ein biotinylierter Sekundär-Antikörper, der an den Primär-Antikörper bindet verwendet. Das Streptavidin bildet mit einem biotinylierten Marker, hier der Meerrettich-Peroxidase (HRP) einen Komplex und bindet an den biotinylierten Antikörper. Die HRP verwendet Wasserstoffperoxid als Substrat. Vor der Immunmarkierung wird dieses im Überschuss eingesetzt um endogene Peroxidasen zu blocken (ROMEIS, 2010). In dieser Untersuchung wurde dafür Hydrogenperoxid verwendet. Das Wasserstoffperoxid wird erst nach der Antikörperbindung umgesetzt. Der ebenfalls zugesetzte Farbstoff 3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Firma Biotrend, Köln) wird dabei oxidiert und es entsteht eine Braunfärbung (ROMEIS, 2010). Die Antikörper-Bindung an das gesuchte Substrat wird sichtbar.

Für den immunhistologischen Nachweis von COX I wurde statt der ABC-Methode Streptavidin/FITC verwendet. Dabei wird der biotinylierte Sekundär-Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und der Komplex dadurch sichtbar gemacht. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Antikörper (AK).

Tabelle 7 Übersicht über die verwendeten Antikörper

Primär-Antikörper (Hersteller)	AK-liefernde Tierart	Verdünnung und Inkubation	Sekundär-Antikörper (Hersteller)	Verdünnung und Inkubation
Laminin (e)	Kaninchen	1 : 500 Über Nacht bei 6 °C	Anti-Kaninchen biot. vom Schwein (a)	1 : 300 30 Minuten bei Raumtemperatur
Vimentin (a)	Maus	1 : 500 Über Nacht bei 6 °C	Anti-Maus biot. vom Kaninchen (a)	1 : 300 30 Minuten bei Raumtemperatur
SMA ( $\alpha$ -smooth-muscle-actin) (a)	Maus	1 : 40 60 Minuten bei Raumtemperatur	Anti Maus biot. vom Kaninchen (a)	1 : 300 30 Minuten bei Raumtemperatur
Panzyto-keratin (c)	Maus	1 : 100 Über Nacht bei 6 °C	Anti-Maus biot. vom Kaninchen (a)	1 : 300 30 Minuten bei Raumtemperatur
Cytokeratin 5 (b)	Meerschweinchen	1 : 50 Über Nacht bei 6 °C	Anti-Meer-schweinchen biot. von der Ziege (d)	1 : 300 30 Minuten bei Raumtemperatur
Cytokeratin 7 (b)	Maus	1 : 100 Über Nacht bei 6 °C	Anti-Maus biot. vom Kaninchen (a)	1 : 300 30 Minuten bei Raumtemperatur

Cytokeratin 8 (f)	Maus	1 : 500  Über Nacht  bei 6 °C	Anti-Maus biot. vom Kaninchen (a)	1 : 300  30 Minuten bei Raum- temperatur
Cytokeratin 14 (b)	Meer- schweinchen	1 : 100  Über Nacht  bei 6 °C	Anti-Meer- schweinchen biot. von der Ziege (d)	1 : 300  30 Minuten bei Raum- temperatur
Cytokeratin 18 (b)	Meer- schweinchen	1 : 200  Über Nacht  bei 6 °C	Anti-Meer- schweinchen biot. von der Ziege (d)	1 : 300  30 Minuten bei Raum- temperatur
Cytokeratin 19 (b)	Meer- schweinchen	1 : 200  Über Nacht  bei 6 °C	Anti-Meer- schweinchen biot. von der Ziege (d)	1 : 300  30 Minuten bei Raum- temperatur
COX I (g)	Kaninchen	1 : 250  Über Nacht  bei 6 °C	Anti- Kaninchen von der Ziege FITC (d)	1 : 400  30 Minuten bei Raum- temperatur

Hersteller der verwendeten Antikörper:

- (a) Firma Dako, Hamburg
- (b) Firma Progen, Heidelberg
- (c) Firma Biocarta, Hamburg
- (d) Firma Vector Laboratories, Burlingame, USA
- (e) Firma Serotec, Düsseldorf
- (f) Firma Novus Biologicals, Cambridge, UK
- (g) Firma Abcam, Cambridge, UK

Es wurden Bouin-fixierte Schnitte von einer Dicke von 5 µm verwendet und außer bei COX I nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (zweimal je 30 Minuten) und rehydrieren in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest (zweimal je 5 Minuten)
- Dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Bei Laminin, Vimentin, Cytokeratin 7 und 8:

Vorbehandlung mit 0,1 % Protease (Firma Sigma-Aldrich, Steinheim) für 10 Minuten bei Raumtemperatur

Bei Pancytokeratin:

Vorbehandlung mit Trypsin (Firma Sigma-Aldrich, Steinheim) für 20 Minuten bei Raumtemperatur

Nach der Vorbehandlung dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)

- Schnitte für 10 Minuten in 50 ml Hydrogenperoxid verdünnt in 150 ml Aqua dest. bei Raumtemperatur belassen
- Spülen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
- Dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Schnitte mit Dako Protein Block Serum Free (Firma Dako, Hamburg) betropfen und für 10 Minuten in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubieren
- Primär-Antikörper in Dako Antibody Diluent (Firma Dako, Hamburg) verdünnen, pro Schnitt 100 µl auftragen und in feuchter Kammer inkubieren (Verdünnung und Inkubation siehe Tabelle 7)
- Vor Weiterbehandlung die Schnitte 60 Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen (außer bei SMA)
- Dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Sekundär-Antikörper verdünnt in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4) pro Schnitt

100 µl aufbringen und in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubieren (Verdünnung und Inkubation siehe Tabelle 7)

- Dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Pro Schnitt 100 µl Streptavidin-HRP (Firma Menarini, Berlin) auftropfen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Kammer belassen
- Dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Zugedeckt die Schnitte für 8 Minuten in DAB-Hydrogenperoxid-Lösung belassen
- 2 - 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- Die Schnitte zur Gegenfärbung der Zellkerne für 30 Sekunden in Hämalun verbringen
- 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- Die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und zweimal 10 Minuten in Xylol entwässern
- Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt®

Bei der Untersuchung mit COX I wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (zweimal je 30 Minuten) und rehydrieren in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest. (zweimal je 5 Minuten)
- Dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Die Schnitte im Citratpuffer (pH-Wert 6,0) für dreimal 10 Minuten in der Mikrowelle inkubieren und anschließend 20 Minuten abkühlen lassen
- Dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Schnitte mit Dako Protein Block Serum Free (Firma Dako, Hamburg) betropfen und für 10 Minuten in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubieren
- Primär-Antikörper in Dako Antibody Diluent (Firma Dako, Hamburg)

verdünnen, pro Schnitt 100 µl auftragen und in feuchter Kammer inkubieren (Verdünnung und Inkubation siehe Tabelle 7)

- Vor Weiterbehandlung die Schnitte 60 Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen
- Dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- 100 µl pro Schnitt Sekundär-Antikörper verdünnt in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4, Konzentration siehe Tabelle 7) aufbringen und 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- Dreimal je 5 Minuten waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Mit Aqua dest. die Schnitt spülen
- Abschließend jeden Schnitt einzeln mit DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI H 1200, Vector Laboratories Inc, Burlingame) beschichten und sofort mit durchsichtigem Nagellack eindeckeln
- Schnitte abgedunkelt im Kühlschrank aufbewahren.

#### Negativkontrolle:

Es wurden bei allen immunhistologischen Untersuchungen Negativkontrollen durchgeführt. Dabei wurde anstatt des Primär-Antikörpers nur Dako Antibody Diluent (Firma Dako, Hamburg) aufgetragen.

#### Positivkontrolle:

Um das Funktionieren des jeweilig verwendeten Antikörpers zu überprüfen, wurden Positivkontrollen angefertigt. Hierzu wurde Gewebe bei dem bekannt ist, dass es mit dem entsprechenden Antikörper reagiert verwendet.

#### Auswertung:

Die Auswertung und Fotodokumentation der Präparate der immunhistologischen Untersuchungen erfolgte an einem Mikroskop (Aritoplan®) der Firma Leitz, Wetzlar. An diesem war eine Kamera (Lumenera USB Camera® Release 3.8) der Firma Lumenera Corporations, Ontario, Kanada angeschlossen. Die

fluoreszenzmikroskopische Auswertung und Fotodokumentation bei COX I erfolgte an einem Mikroskop (Axiovert 200M®) der Firma Zeiss, Oberkochen. An diesem war eine Kamera (Axiocam ICc 1®) der Firma Zeiss, Oberkochen angeschlossen.

## **6. Transmissionselektronenmikroskopie**

Auswertung:

Die Ultradünnschnitte wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 (Firma Zeiss, Oberkochen) fotografiert und ausgewertet.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Lichtmikroskopische Untersuchungen am Nebenhoden

Der Nebenhoden, der sowohl durch das Lig. testis proprium als auch das Mesoepididymidis fest am Hoden fixiert ist, liegt diesem dorsal auf. Er kann bereits makroskopisch leicht in drei Abschnitte, den Nebenhodenkopf, Caput epididymidis, den Nebenhodenkörper, Corpus epididymidis und den Nebenhodenschwanz, Cauda epididymidis unterteilt werden (Bild 1).

Mikroskopisch kann man allerdings in vier Abschnitte unterteilen. Im Nebenhodenkopf sind neben dem Initialsegment des Ductus epididymidis, welches in der Literatur oft mit dem Caput epididymidis gleichgesetzt wird, auch die Ductuli efferentes beherbergt. Das Mittelsegment entspricht dem Nebenhodenkörper und das Terminalsegment dem Nebhodenschwanz. Die Einteilung der Abschnitte erfolgte aufgrund der Epithelhöhe, des Lumendurchmessers des Nebenhodengangs, des Oberflächenbesatzes und des Vorkommens von Zellarten.

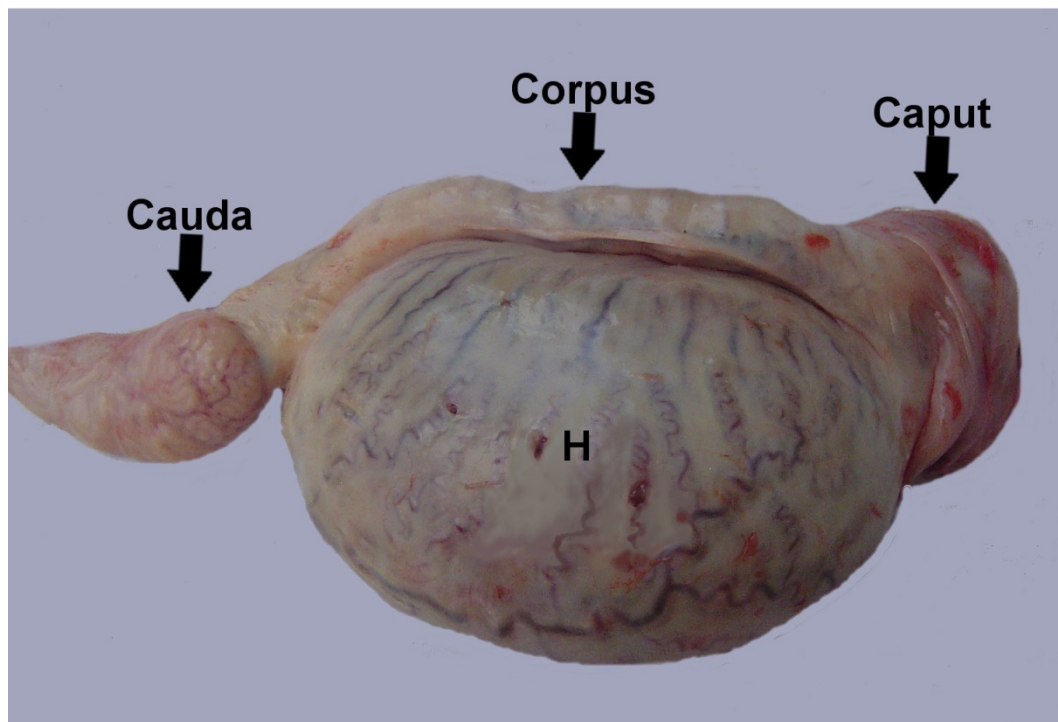


Bild 1 Makroskopische Einteilung des Nebenhodens

Der Nebenhoden liegt dem Hoden (H) dorsal auf und wird unterteilt in Caput, Corpus und Cauda epididymidis.



### 1.1. Ductuli efferentes

Die Ductuli efferentes entspringen aus dem Rete testis des Hodens und durchstoßen die Tunica albuginea. Sie stellen die Verbindung zum Ductus epididymidis dar. Das unterschiedlich hohe Epithel (16 – 28 µm) der Ductuli efferentes ist mehrreihig hochprismatisch und niedriger als das aller Abschnitte des Ductus epididymidis. Es beinhaltet zwei verschiedene Zelltypen. Die Hauptzellen stellen den größeren Anteil dar. Ihr längsovaler, durchschnittlich 7 µm lange und 4 µm breite Zellkern verfügt über einen dominanten Nukleolus und weitere ein bis zwei kleinere Nukleoli. Auf der luminalen Oberfläche tragen sie einen Mikrovillibesatz, der durchschnittlich 1 µm ins Ganglumen reicht (Bild 3). Im Vergleich zu der zweiten vorkommenden Zellart ist das Zytoplasma der Hauptzellen deutlich heller. Die Zellen mit dunklerem Zytoplasma bezeichnet man als Zilienzellen (Bild 4). Ihr Zellkern ist längsoval bis rund mit einem Durchmesser von 6 µm und liegt zentral bis luminal in der Zelle. Auch hier ist ein dominanter Nukleolus zu erkennen (Bild 3). An der luminalen Seite tragen diese Zellen durchschnittlich 8 µm lange Kinozilien (Bild 3 und Bild 5). Auf die deutlich erkennbare Basallamina folgen zwei bis drei lockere Muskelzellschichten (etwa 11 µm stark) und gefäßreiches Bindegewebe (Bild 6). Das runde, glatte Lumen der Ductuli efferentes hat Durchmesser von bis zu 180 µm (Bild 2). Es beinhaltet keine oder nur eine geringe Anzahl an Spermien (Bild 6) und Zellfragmenten (Bild 5).

In der Alcianblau-Färbung mit einem pH-Wert von 1 reagieren nur die vereinzelt im Bindegewebe vorkommenden Mastzellen stark positiv. Bei einem pH-Wert von 2,5 reagieren neben den Mastzellen im Bindegewebe sowohl die Zellfragmente im Lumen, als auch die Kinozilien stark positiv (Bild 5).

Bei der PAS-Reaktion zeigen die Basallamina und der apikale Epithelsaum eine deutlich positive Färbung (Bild 6). Mit vorhergehender Methylierung ist der apikale Epithelsaum noch deutlich positiv, wogegen sich die Basallamina nur noch schwach positiv darstellt. Die PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung lässt nur die Basallamina deutlich positiv reagieren. Durch die Acetylierung vor der PAS-Reaktion ist keine positive Reaktion in den Ductuli efferentes zu erkennen.

Bei der Sirius Red-Färbung wurden keine eosinophilen Granulozyten dargestellt.

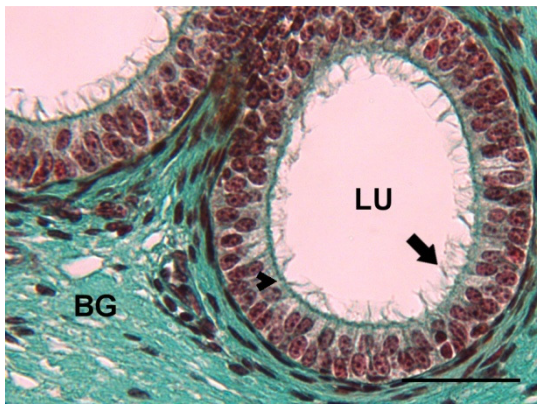


Bild 2 Ductuli efferentes, Goldner-Färbung, SB = 40  $\mu$ m

Die in Bindegewebe (BG) eingebetteten Ductuli efferentes weisen ein rundes Lumen (LU) auf. Die Kinozilien (Pfeil) der Zilienzellen reichen in das Lumen.

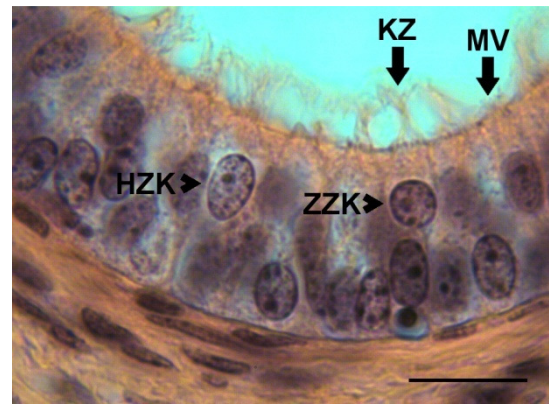


Bild 3 Ductuli efferentes, H.E.-Färbung, SB = 10  $\mu$ m

Die Zilienzellen haben einen längsovalen bis runden Zellkern (ZZK) und tragen auf ihrer luminalen Oberfläche Kinozilien (KZ). Der Zellkern der Hauptzellen (HZK) ist längsoval, luminal tragen die Hauptzellen einen Mikrovillibesatz (MV).

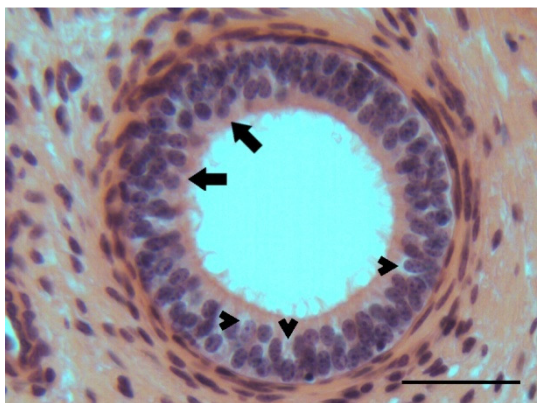


Bild 4 Ductuli efferentes, HE-Färbung, SB = 40  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Hauptzellen (Pfeilspitzen) ist deutlich heller als das der Zilienzellen (Pfeile).

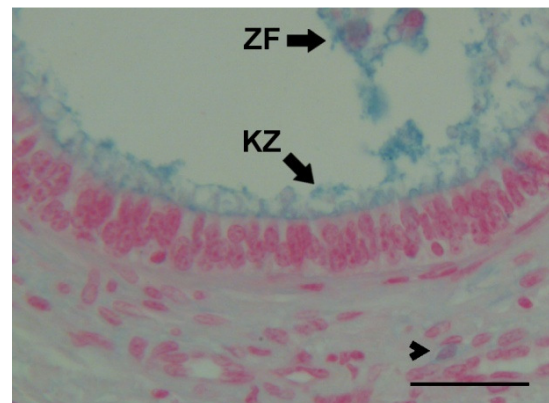


Bild 5 Ductuli efferentes, Alcianblau-Färbung pH = 2,5, SB = 40  $\mu$ m

Die ins Lumen reichenden Kinozilien (KZ) und die im Lumen befindenden Zellfragmente (ZF) reagieren ebenso wie die Mastzellen (Pfeilspitze) stark positiv.

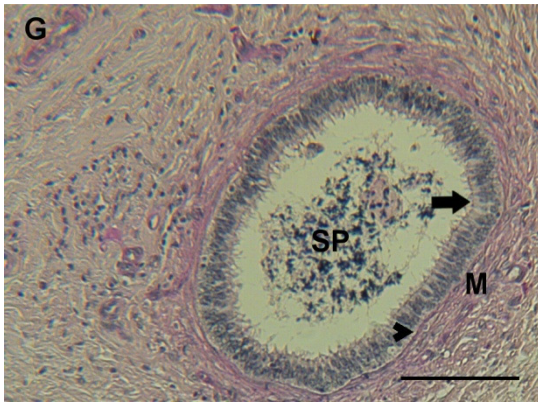


Bild 6 Ductuli efferentes, PAS-Färbung,  
SB = 100  $\mu$ m

Der Basallamina (Pfeilspitze) schließt sich zuerst eine Muskelschicht (M) und dann Bindegewebe mit Gefäßen (G) an. Im Lumen sind nur selten Spermien (SP) zu finden. Der apikale Epithelsaum ist deutlich erkennbar (Pfeil).

Tabelle 8 Histomorphologische Befunde der Ductuli efferentes

Vorhandene Zelltypen	Hauptzellen	
	Zilienzellen	
Hauptzellen	Zellkernform	Längsoval
	Zellkernlage	Basale Zellhälfte
	Nukleoli	Ein dominanter, ein bis zwei weitere Nukleoli
	Mikrovilli	Gleichmäßig
Zilienzellen	Zellkernform	Längsoval bis rund
	Zellkernlage	Zentral bis luminal
	Nukleoli	Ein dominanter, weitere kleinere Nukleoli
	Kinozilien	8 µm lang
Basallamina	Deutlich erkennbar, regelmäßig	
Muskelschicht	Zwei bis drei Lagen	
Bindegewebe	Mehrere Blutgefäße	
Lumen	Form	Rund, glatt
	Inhalt	Wenig Spermien, Zellfragmente

## **1.2. Ductus epididymidis**

### **1.2.1. Caput epididymidis bzw. Initialsegment**

Das Initialsegment des Ductus epididymidis ist durch einen deutlichen Anstieg der Epithelhöhe (73 – 110 µm) von den Ductuli efferentes abzugrenzen. Das Epithel ist hier mehrreihig, hochprismatisch und gewellt, was zu einem sternförmigen Lumen führt (Bild 7). Es sind drei Zellformen zu unterscheiden: Hauptzellen, Basalzellen und vereinzelt Apikalzellen. Die häufigsten Zellen sind die lang gezogenen Hauptzellen. Sie tragen ihren längsovalen, senkrecht zur Basallamina liegenden Zellkern (9 µm lang und 4,5 µm breit) im basalen Zelldrittel. Dieser besitzt ein bis zwei Nukleoli. An ihrer luminalen Oberfläche tragen die Hauptzellen durchschnittlich 13 µm lange Stereozilien. Die Basalzellen liegen der Basallamina direkt auf und bilden eine geschlossene Kette. Ihr Zellkern ist rund, durchschnittlich 6 µm groß und besitzt meist nur einen Nukleolus. Durch die Lage der Kerne dieser zwei Zellarten bildet sich im Epithel ein Kernbereich in der basalen Epithelhälfte. Die Kerne der vereinzelt vorkommenden Apikalzellen liegen dagegen im luminalen Epitheldrittel, gleichen aber sonst in ihrer Form denen der Hauptzellen (Bild 8). Der kräftigen Basallamina schließen sich drei bis vier glatte Muskelzelllagen (etwa 25 µm stark) und Bindegewebe an (Bild 9 und 11). Im für diesen Abschnitt charakteristisch sternförmigen, mit einem Durchmesser von bis zu 505 µm großen Lumen sind wenig Spermien und Zellfragmente vorzufinden (Bild 9).

Die Ergebnisse der Alcianblau-Färbung ist ähnlich wie bei den Ductuli efferentes. Bei einem pH-Wert von 1,0 reagieren nur vereinzelt im Bindegewebe vorkommende Mastzellen deutlich positiv. Bei einem pH-Wert von 2,5 reagieren auch die Stereozilien positiv (Bild 10).

Bei der PAS-Reaktion (mit und ohne Amylasevorbehandlung) zeigt sich die Basallamina im Initialsegment stark positiv. Der apikale Epithelsaum und die Stereozilien sind deutlich positiv gefärbt (Bild 9). Ausserdem reagieren die Muskelschicht und das Endothel der im Bindegewebe liegenden Gefäße deutlich bis stark positiv (Bild 11).

Durch die vorhergehende Methylierung wird die PAS-Reaktion abgeschwächt und der apikale Epithelsaum, die Stereozilien und die Muskelschicht zeigen sich nur noch schwach positiv. Die Basallamina färbt sich deutlich rosa. Die PAS-Reaktion mit Acetylierung ist negativ.

Bei der Sirius Red-Färbung konnten keine eosinophilen Granulozyten dargestellt werden.



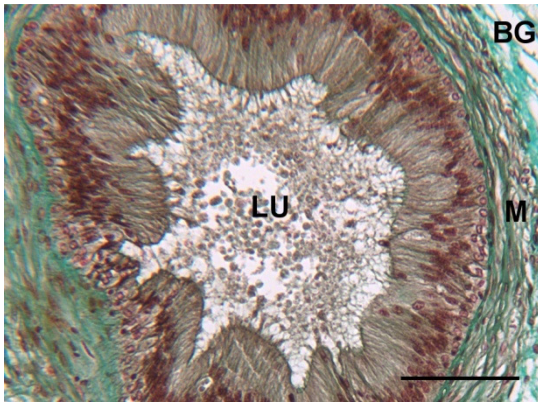


Bild 7 Initialsegment, Goldner-Färbung, SB = 100  $\mu$ m

Der Ductus epididymidis ist in Bindegewebe (BG) eingebettet. Zwischen Gang und Bindegewebe liegen im Initialsegment drei bis vier Schichten glatter Muskelzellen (M). Das Lumen (LU) ist in diesem Abschnitt sternförmig.



Bild 8 Initialsegment, H.E.-Färbung, SB = 40  $\mu$ m

Die Kerne der Hauptzellen (HZK) sind längsoval und liegen im basalen Zelldrittel. Die ihnen sehr ähnlichen Kerne der Apikalzellen (AZK) liegen dagegen im luminalen Epitheldrittel. Auf der luminalen Oberfläche tragen die Hauptzellen Stereozilien (SZ). Die Basalzellkerne (BZK) liegen basal in einer Reihe.

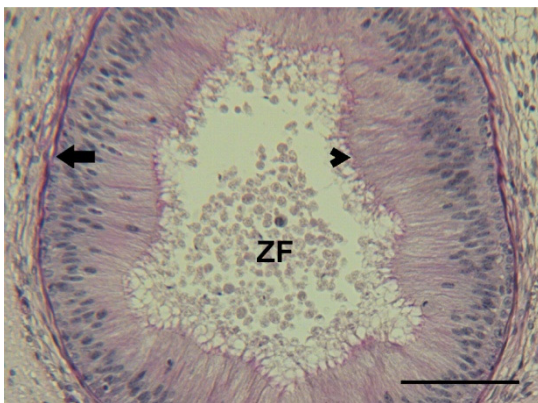


Bild 9 Initialsegment, PAS-Färbung, SB = 100  $\mu$ m

Im Initialsegment liegen wenig Spermien und Zellfragmente (ZF) im Lumen. Der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) ist deutlich zu erkennen. Die Basallamina (Pfeil) ist kräftig.



Bild 10 Initialsegment, Alcianblau pH = 2,5, SB = 40  $\mu$ m

Die Stereozilien (Pfeilspitze) reagieren deutlich positiv.

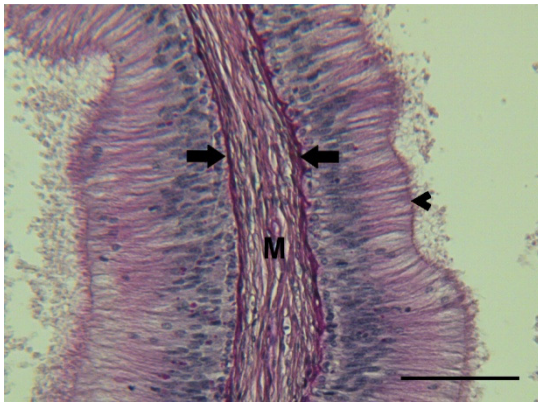


Bild 11 Initialsegment, PAS-Färbung, SB  
= 100  $\mu$ m

Der gut erkennbare apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) reagiert deutlich, die Basallamina (Pfeile) stark positiv. Die Muskelzellschicht (M) zeigt sich deutlich bis stark positiv.



Tabelle 9 Histomorphologische Befunde des Initialsegments

Vorhandene Zelltypen	Hauptzellen	
	Basalzellen	
	Apikalzellen	
Hauptzellen	Zellkernform	Längsoval
	Zellkernlage	Senkrecht zur Basallamina, basales Zelldrittel
	Nukleoli	Ein bis zwei Nukleoli
	Stereozilien	13 µm lang
Basalzellen	Zellkernform	Rund
	Zellkernlage	Nahe der Basallamina
	Nukleoli	Ein Nukleolus
Apikalzellen	Zellkernform	Längsoval
	Zellkernlage	Luminales Epitheldrittel
	Nukleoli	Zwei bis drei Nukleoli
Basallamina	Kräftig, regelmäßig	
Muskelschicht	Drei bis vier Lagen	
Bindegewebe	Mehrere Blutgefäße, zum Teil mit größerem Lumen	
Lumen	Form	Sternförmig
	Inhalt	Wenig Spermien, Zellfragmente

### 1.2.2. Corpus epididymidis bzw. Mittelsegment

Das mehrreihige, hochprismatische Epithel hat in diesem Abschnitt eine Höhe von durchschnittlich 57  $\mu\text{m}$ . Neben den Haupt-, Basal- und Apikalzellen (Bild 13) sind hier auch Lymphozyten und basal gelegene Makrophagen zu erkennen. Der Kern der Hauptzellen liegt in der basalen Zellhälfte und beinhaltet meist zwei Nukleoli. Er ist längsoval, 9  $\mu\text{m}$  lang und 5  $\mu\text{m}$  breit und liegt wie im Initialsegment senkrecht zur Basallamina. Die Stereozilien der Hauptzellen ragen etwa 18  $\mu\text{m}$  weit ins Lumen. Die in niedrigerer Anzahl als im Initialsegment vorkommenden Basalzellen liegen der Basallamina direkt auf und haben einen runden Zellkern mit einem Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  und einem Nukleolus. Apikalzellen treten in diesem Abschnitt kaum noch auf, entsprechen dann aber in Gestalt und Lage denen im Initialsegment (Bild 13). Die sich der Basallamina anschließenden Muskelschicht umfasst drei bis vier Zelllagen und misst etwa 20  $\mu\text{m}$ . Das Bindegewebe beinhaltet im Mittelsegment deutlich mehr und größere Gefäße als in den vorhergehenden Abschnitten. Das durchschnittlich 311  $\mu\text{m}$  große, runde und glatte Lumen ist gefüllt mit einer Vielzahl von Spermien und nur vereinzelt Zellfragmenten (Bild 12).

Die Alcianblau-Färbung zeigt bei einem pH-Wert von 1 die hier in geringerer Anzahl vorkommenden Mastzellen im Bindegewebe deutlich positiv. Die Stereozilien sind bei einem pH-Wert von 2,5 nur schwach blau gefärbt.

Bei der PAS-Reaktion zeigen sich neben der Basallamina auch die Basalzellen stark positiv. Die Stereozilien und der apikale Epithelsaum färben sich deutlich positiv an. Schwach positiv zeigen die Muskelschicht und die Apikalzone der Hauptzellen (Bild 14). Während die PAS-Reaktion mit vorhergehender Acetylierung wieder vollständig negativ verläuft, reagiert die Basallamina bei der PAS-Reaktion mit Methylierung deutlich positiv, die Stereozilien hingegen ebenfalls negativ. Durch die Vorbehandlung mit Amylase reagieren die Basallamina und das Zytoplasma der Basalzellen deutlich positiv. Dadurch können die, bis zum Lumen reichenden Zellausläufer der Basalzellen deutlich erkannt werden. Basal gelegene Granula reagieren deutlich bis stark positiv (Bild 15).

Bei der Sirius Red-Färbung konnten keine eosinophilen Granulozyten dargestellt werden.

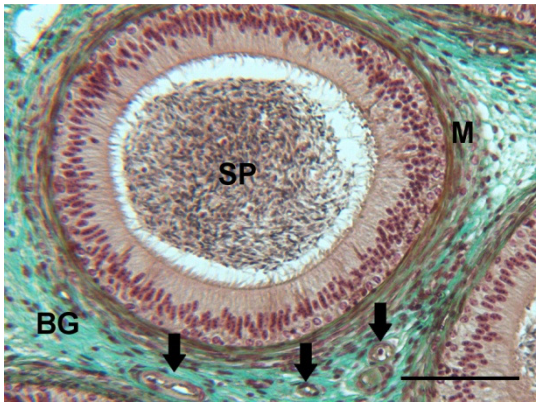


Bild 12 Mittelsegment, Goldner-Färbung, SB = 100  $\mu$ m

Das Lumen ist im Mittelsegment rund und glatt und mit einer Vielzahl von Spermien (SP) gefüllt. Die Muskelschicht (M) besteht aus drei bis vier Zellschichten. Im anschließenden Bindegewebe (BG) liegen deutlich mehr Gefäße (Pfeile) als in den vorhergehenden Abschnitten.

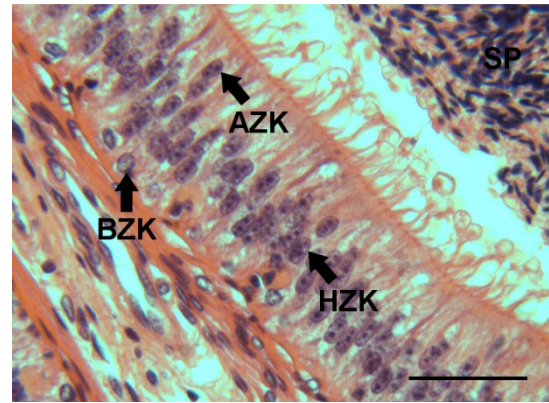


Bild 13 Mittelsegment, H.E.-Färbung, SB = 40  $\mu$ m

Die im Mittelsegment weniger häufig vorkommenden Basalzellen haben einen runden Zellkern (BZK) und liegen der Basallamina direkt auf. Der Hauptzellkern (HZK) ist längsoval. Die Anzahl der Apikalzellen nimmt deutlich ab, ihr Zellkern (AZK) entspricht dem im Initialsegment.

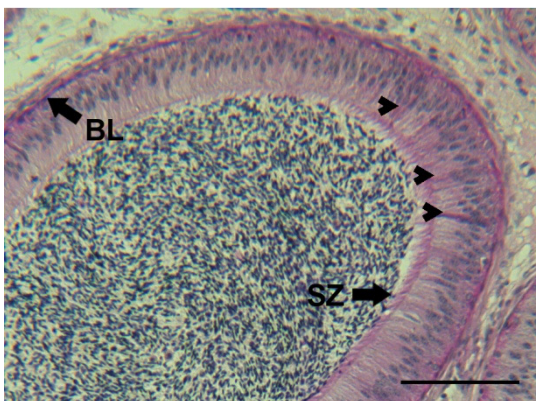


Bild 14 Mittelsegment, PAS-Färbung, SB = 100  $\mu$ m

Die Stereozilien (SZ) reagieren deutlich, die Basallamina (BL) stark positiv. Das Zytoplasma der Basalzellen reagiert ebenfalls stark positiv, wodurch die bis an das Lumen reichenden Zellausläufer (Pfeilspitzen) deutlich erkennbar werden.

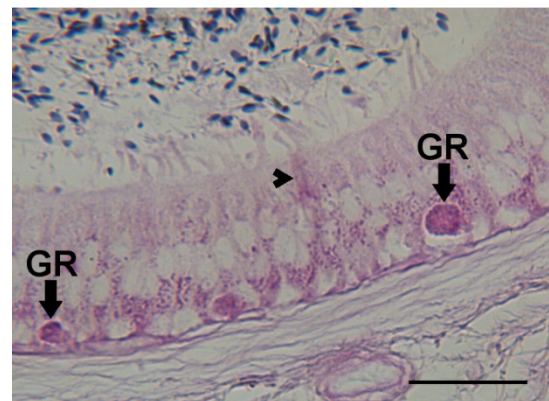


Bild 15 Mittelsegment, PAS-Färbung mit Amylase-Behandlung, SB = 40  $\mu$ m

Neben den deutlich erkennbaren Zellausläufern der Basalzellen (Pfeilspitze) reagieren basal gelegene Granula (GR) deutlich bis stark positiv.

Tabelle 10 Histomorphologische Befunde des Mittelsegments

Vorhandene Zelltypen	Hauptzellen	
	Basalzellen	
	Apikalzellen	
Hauptzellen	Zellkernform	Längsoval
	Zellkernlage	Senkrecht zur Basallamina, basale Zellhälfte
	Nukleoli	Zwei Nukleoli
	Stereozilien	18 µm lang
Basalzellen	Zellkernform	Rund
	Zellkernlage	Nahe der Basallamina
	Nukleoli	Ein Nukleolus
Apikalzellen	Zellkernform	Längsoval
	Zellkernlage	Luminales Epitheldrittel
	Nukleoli	Zwei bis drei Nukleoli
Basallamina	Regelmäßig	
Muskelschicht	Drei bis vier Lagen	
Bindegewebe	Mehrere Blutgefäße mit größerem Lumen	
Lumen	Form	Rund
	Inhalt	Spermien, wenig Zellfragmente

### 1.2.3. Cauda epididymidis bzw. Terminalsegment

Das mit einer durchschnittlichen Höhe von 35 µm niedrige Epithel zeigt im Terminalsegment in das Lumen reichende Zotten von verschieden starker Ausprägung (Bild 16). Es kommen zwei Zelltypen vor: Die Hauptzellen und die Basalzellen. Apikalzellen sind nicht mehr aufzufinden. Die Hauptzellen tragen in das Lumen reichende, etwa 8 µm lange Stereozilien. Der längsovale Zellkern dieser Zellen (7 µm lang und 3 µm breit) nimmt die basale Zellhälfte ein und enthält meist zwei deutliche Nukleoli. Der geringe Anteil der Basalzellen liegt weiter der Basallamina direkt auf. Ihr runder bis querovale Kern (Durchmesser: 2,5 µm) weist nur einen, oft undeutlichen Nukleolus auf (Bild 17). In der Goldner-Färbung ist gut zu erkennen, dass sich nach der Basallamina zunächst eine deutlich ausgeprägte durchschnittlich 27 µm dicke Bindegewebsschicht anschließt. Dieses Bindegewebe ist auch Basis für die in das Lumen reichenden Zotten. Im Anschluss folgt eine mächtige, durchschnittlich 115 µm starke Muskelschicht (Bild 16). Das mit einem Durchmesser von zum Teil über 1000 µm größte Lumen ist durch die Zotten des Epithels von charakteristischer Form. Es beinhaltet den deutlich größten Anteil an Spermien, sodass bereits bei der Präparation milchige Flüssigkeit austritt.

Die Alcianblau-Färbung bei einem pH-Wert von 1,0 zeigt eine stark positive Reaktion der hier nur sehr vereinzelt im Bindegewebe vorkommenden Mastzellen. Bei einem pH-Wert von 2,5 reagieren zusätzlich die Stereozilien stark positiv (Bild 18).

Bei der PAS-Reaktion mit und ohne Amylase-Vorbehandlung reagiert die Basallamina stark, die Bindegewebsschicht zwischen Epithel und Muskelschicht deutlich und die Stereozilien schwach positiv (Bild 19). Mit vorhergehender Methylierung ist die Bindegewebsschicht nur noch schwach positiv und die Stereozilien negativ. Durch die Vorbehandlung mit Acetylierung ist keine positive Reaktion mehr erkennbar.

Bei der Sirius Red-Färbung konnten keine eosinophilen Granulozyten dargestellt werden.



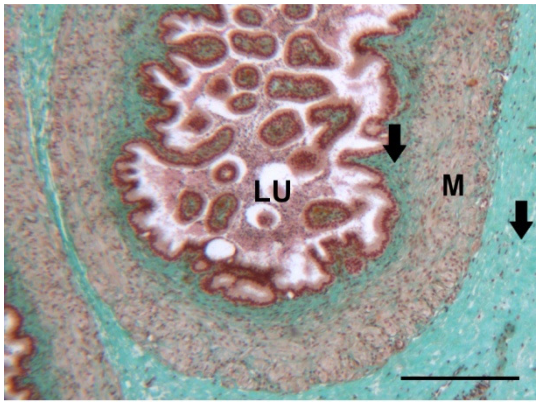


Bild 16 Terminalsegment, Goldner-Färbung, SB = 250  $\mu$ m

Im durch Epithelzotten eingeschnürten Lumen (LU) liegt der Hauptanteil der Spermien. Der Basallamina schließt sich zunächst Bindegewebe (Pfeil) dann die kräftige Muskelschicht (M) und schließlich wieder Bindegewebe (Pfeil) an.

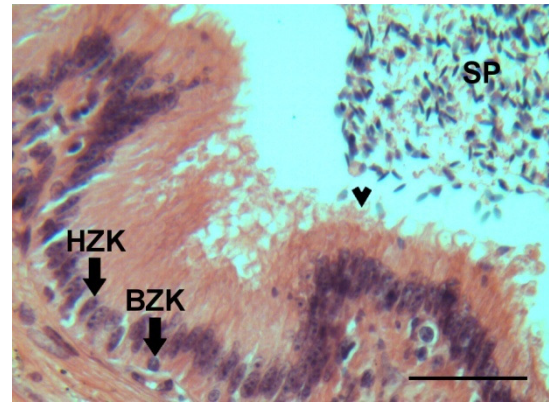


Bild 17 Terminalsegment, H.E.-Färbung, SB = 40  $\mu$ m

Die nur noch selten anzutreffenden Basalzellen, tragen ihren Zellkern (BZK) weiterhin basal. Die Kerne der Hauptzellen (HZK) sind wie in den anderen Abschnitten längsoval. Stereozilien (Pfeilspitze) ragen in das mit Spermien (SP) gefüllte Lumen.

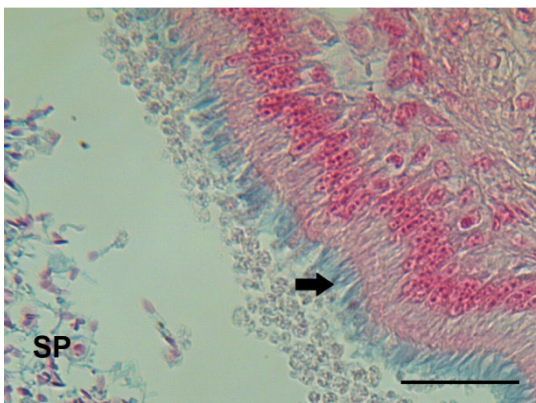


Bild 18 Terminalsegment, Alcianblau-Färbung pH-Wert = 2,5, SB = 40  $\mu$ m

Die in das mit Spermien (SP) gefüllte Lumen reichenden Stereozilien (Pfeil) reagieren stark positiv.

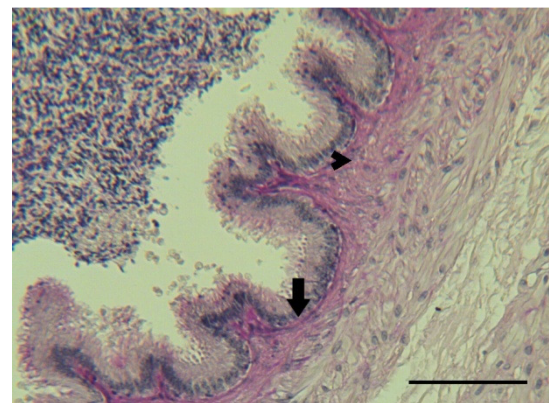


Bild 19 Terminalsegment, PAS-Färbung, SB = 100  $\mu$ m

Die Basallamina (Pfeil) reagiert stark positiv, das sich anschließende Bindegewebe (Pfeilspitze) zeigt sich deutlich positiv.

Tabelle 11 Histomorphologische Befunde des Terminalsegments

Vorhandene Zelltypen	Hauptzellen	
	Basalzellen	
Hauptzellen	Zellkernform	Längsoval
	Zellkernlage	Senkrecht zur Basallamina, basale Zellhälfte
	Nukleoli	Zwei Nukleoli
	Stereozilien	8 µm lang
Basalzellen	Zellkernform	Rund bis queroval
	Zellkernlage	Nahe der Basallamina
	Nukleoli	Ein, oft undeutlicher Nukleolus
Basallamina	Regelmäßig	
Muskelschicht	Mächtig	
Bindegewebe	Mehrere Blutgefäße mit verschiedenem Lumen	
	Zusätzliche Bindegewebsschicht zwischen Basallamina und Muskelschicht	
Lumen	Form	Durch ins Lumen ragende Zotten unregelmäßig
	Inhalt	Vielzahl an Spermien

## 2. Glykohistochemische Untersuchungen am Nebenhoden

### 2.1. Bindungsstellen für *Canavalia ensiformis* Agglutinin (Con A)

In den Ductuli efferentes reagieren die Zilienzellen stark, die Hauptzellen deutlich positiv. Der apikale Epithelsaum und die Kinozilien gehen mit Con A eine Bindung ein, die sich stark positiv angefärbt darstellt (Bild 20). Die Basalzellen weisen in allen drei Nebenhodensegmenten stark positiv reagierende Bindungsstellen mit Con A auf (Bild 21). Die Hauptzellen zeigen sich im Initial-, Mittel- und Terminalsegment deutlich positiv. Eine deutlich positive Reaktion mit Con A im Initial- und Mittelsegment und eine stark positive Reaktion im Terminalsegment zeigen die Stereozilien. Der apikale Epithelsaum reagiert im Initialsegment schwach und im Mittelsegment stark positiv. Im Terminalsegment weist er keine Reaktion mit Con A auf. Der Inhalt des Lumens verhält sich unterschiedlich. Während Zellfragmente zum Teil stark positiv reagieren (vor allem in den Ductuli efferentes und im Initialsegment vorhanden) zeigen sich die Spermien deutlich positiv. Bindegewebe, Muskelzelllage und Gefäße färben sich nicht an.

Tabelle 12 Übersicht über die Con A-Bindungsstellen

Segment	AES	HZ		BZ/ ZZ	SZ/ KZ	BL	M	BG	G	SP/ LU
		ZP	GZ							
D. eff.	+++	++	++	+++	+++	-	-	-	-	+++
Initial	+	++	++	+++	++	-	-	-	-	+++
Mittel	+++	++	++	+++	++	-	-	-	-	++
Terminal	-	++	++	+++	+++	-	-	-	-	++

AES = apikaler Epithelsaum, HZ = Hauptzelle, ZP = Zytoplasma, GZ = Golgi-Zone, BZ/ZZ = Basal-/Zilienzelle, SZ/KZ = Stereozilien/Kinozilien, BL = Basallamina, M = Muskelzellschicht, BG = Bindegewebe, G = Gefäße, SP/LU = Spermien bzw. Lumen

- = negativ, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv



## 2.2. Bindungsstellen für *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)

In den Ductuli efferentes zeigt der apikale Epithelsaum eine stark positive Reaktion. Die Kinozilien und das apikale Zytoplasma der Zilien-tragenden Zellen sind schwach positiv (Bild 22). In diesem Abschnitt und im Initialsegment weist die Muskelschicht eine deutlich positive, im Mittelsegment nur noch eine schwach positive und im Terminalsegment keine Reaktion mit LCA auf. Im Initialsegment sind ansonsten keine Bindungsstellen für LCA im Epithel erkennbar. Die Reaktionen im Mittelsegment sind wieder deutlicher. Hier zeigt sich der apikale Epithelsaum deutlich, die Stereozilien schwach und die Basalzellen sogar stark positiv. Auch im Lumen sind einige Zellen schwach positiv angefärbt (Bild 23). Im Terminalsegment reagieren der apikale Epithelsaum, die Stereozilien und die Basalzellen deutlich positiv mit LCA. Auch die Spermien im Lumen zeigen hier eine deutlich positive Reaktion. Die im negativ reagierenden Bindegewebe auffindbaren Gefäße zeigen eine schwach bis deutlich positive Färbung in allen Abschnitten.

Tabelle 13 Übersicht über die LCA-Bindungsstellen

Segment	AES	HZ		BZ/ ZZ	SZ/ KZ	BL	M	BG	G	SP/ LU
		ZP	GZ							
D. eff.	+++	-	-	+	+	-	++	-	+	-
Initial	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-
Mittel	++	-	-	+++	+	-	+	-	++	+
Terminal	++	-	-	++	++	-	-	-	++	++

AES = apikaler Epithelsaum, HZ = Hauptzelle, ZP = Zytoplasma, GZ = Golgi-Zone, BZ/ZZ = Basal-/Zilienzelle, SZ/KZ = Stereozilien/Kinozilien, BL = Basallamina, M = Muskelzellschicht, BG = Bindegewebe, G = Gefäße, SP/LU = Spermien bzw. Lumen

- = negativ, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### 2.3. Bindungsstellen für *Pisum sativum* Agglutinin (PSA)

Auf das Lektin PSA zeigt der apikale Epithelsaum der Ductuli efferentes eine stark positive Reaktion. Das apikale Zytoplasma beider Epithelzellarten reagiert hier deutlich positiv. Auch die Kinozilien und die dünne Muskelschicht der Ductuli efferentes weisen eine deutlich positive Reaktion auf (Bild 24). Im Initialsegment ist vor allem die stark positive Reaktion des Basalzell-Zytoplasmas zu erkennen. Die Stereozilien und die Golgi-Zone der Hauptzellen zeigen sich schwach positiv. Im Mittelsegment sind die Stereozilien und der apikale Epithelsaum schwach positiv angefärbt. Die Golgi-Zone der Hauptzellen weist hier eine schwach positive Reaktion auf. Die Basalzellen dieses Segments und des Terminalsegments reagieren stark positiv (Bild 25). Im Terminalsegment zeigt sich der apikale Epithelsaum nur noch schwach positiv. Die Gefäße im negativen Bindegewebe sind in allen Abschnitten schwach positiv zu erkennen (Bild 24).

Tabelle 14 Übersicht über die PSA-Bindungsstellen

Segment	AES	HZ		BZ/ ZZ	SZ/ KZ	BL	M	BG	G	SP/ LU
		ZP	GZ							
D. eff.	+++	++	-	++	++	-	++	-	+	-
Initial	-	-	+	+++	+	-	-	-	+	-
Mittel	+		+	+++	+	-	-	-	+	-
Terminal	++	-	-	+++	-	-	-	-	+	-

AES = apikaler Epithelsaum, HZ = Hauptzelle, ZP = Zytoplasma, GZ = Golgi-Zone, BZ/ZZ = Basal-/Zilienzelle, SZ/KZ = Stereozilien/Kinozilien, BL = Basallamina, M = Muskelzellschicht, BG = Bindegewebe, G = Gefäße, SP/LU = Spermien bzw. Lumen

- = negativ, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### 2.4. Bindungsstellen für *Arachis hypogaea* Agglutinin (PNA)

Es waren keine positiven Reaktionen mit dem Lektin PNA zu erkennen.

### 2.5. Bindungsstellen für *Ricinus communis* Agglutinin (RCA)

In den Ductuli efferentes, im Initial-, Mittel- und Terminalsegment ist lediglich eine schwach positive Reaktion der im Lumen vorhandenen Spermien zu erkennen. Das Epithel der Ductuli efferentes reagiert zusätzlich schwach positiv.

Tabelle 15 Übersicht über die RCA-Bindungsstellen

Segment	AES	HZ		BZ/ ZZ	SZ/ KZ	BL	M	BG	G	SP/ LU
		ZP	GZ							
D. eff.	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Initial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Mittel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Terminal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

AES = apikaler Epithelsaum, HZ = Hauptzelle, ZP = Zytoplasma, GZ = Golgi-Zone, BZ/ZZ = Basal-/Zilienzone, SZ/KZ = Stereozilien/Kinozilien, BL = Basallamina, M = Muskelzellschicht, BG = Bindegewebe, G = Gefäße, SP/LU = Spermien bzw. Lumen

- = negativ, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### 2.6. Bindungsstellen für *Erythrina cristagalli* Agglutinin (ECA)

Es waren keine positiven Reaktionen im Nebenhoden des Pferdes mit dem Lektin ECA zu erkennen.

### 2.7. Bindungsstellen für *Glycine max* Agglutinin (SBA)

Bei der glykohistochemischen Untersuchung mit SBA waren keine positiven Reaktionen vorzufinden.

### 2.8. Bindungsstellen für *Griffonia simplicifolia* Agglutinin (GSL I)

Für GSL I konnten keine Bindungsstellen im Nebenhoden des Pferdes ausfindig gemacht werden.

### 2.9. Bindungsstellen für *Saphora japonica* Agglutinin (SJA)

Bis auf das Epithel der Ductuli efferentes, welches schwach positiv reagiert, sind keine positiven Reaktionen mit SJA im Nebenhoden feststellbar.

Tabelle 16 Übersicht über die SJA-Bindungsstellen

Segment	AES	HZ		BZ/ ZZ	SZ/ KZ	BL	M	BG	G	SP/ LU
		ZP	GZ							
D. eff.	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Initial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mittel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terminal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AES = apikaler Epithelsaum, HZ = Hauptzelle, ZP = Zytoplasma, GZ = Golgi-Zone, BZ/ZZ = Basal-/Zilienzelle, SZ/KZ = Stereozilien/Kinozilien, BL = Basallamina, M = Muskelzellschicht, BG = Bindegewebe, G = Gefäße, SP/LU = Spermien bzw. Lumen

- = negativ, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

#### 2.10. Bindungsstellen für *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA)

Es sind keine Bindungsstellen für DBA im Nebenhoden des Pferdes nachzuweisen.

#### 2.11. Bindungsstellen für *Triticum vulgare* Agglutinin (WGA)

In den Ductuli efferentes zeigen sich die WGA-Bindungsstellen durch eine stark positive Reaktion des apikalen Epithelsaums und des apikalen Zytoplasmas der Zilienzellen. Auch das Zytoplasma der Hauptzellen reagiert hier deutlich positiv. Die Kinozilien treten nur schwach positiv in Erscheinung. Die Spermien weisen in den Ductuli efferentes sowie in allen anderen Abschnitten eine deutlich positive, im Terminalsegment sogar zum Teil eine stark positive Reaktion auf. Im Initialsegment erscheinen der apikale Epithelsaum und die Basalzellen stark positiv. Die Stereozilien, die Golgi-Zone der Hauptzellen und die Basallamina reagieren hier deutlich positiv. Ebenso zeigt sich die Muskelschicht im Initialsegment deutlich positiv (Bild 26). Im Mittelsegment treten die WGA-Bindungsstellen vor allem durch eine stark positive Reaktion der Basalzellen in Erscheinung. Zudem weist der apikale Epithelsaum eine deutlich positive Reaktion auf. Die Golgi-Zone der Hauptzellen, die Stereozilien, die Basallamina und die Muskelschicht reagieren in diesem Segment nur schwach positiv mit WGA. Im Terminalsegment sind der apikale Epithelsaum, die Stereozilien und auch die Basalzellen als stark positiv zu beobachten. Die Muskelschicht zeigt sich

hier nur schwach positiv angefärbt (Bild 27). Die im Bindegewebe liegenden Gefäße weisen durchgehend eine schwach positive Reaktion auf.

Tabelle 17 Übersicht über die WGA-Bindungsstellen

Segment	AES	HZ		BZ/ ZZ	SZ/ KZ	BL	M	BG	G	SP/ LU
		ZP	GZ							
D. eff.	+++	++	-	+++	+	-	-	-	+	++
Initial	+++	-	++	+++	++	++	++	-	+	++
Mittel	++	-	+	+++	+	+	+	-	+	++
Terminal	+++	-	-	+++	+++	-	+	-	+	+++

AES = apikaler Epithelsaum, HZ = Hauptzelle, ZP = Zytoplasma, GZ = Golgi-Zone, BZ/ZZ = Basal-/Zilienzelle, SZ/KZ = Stereozilien/Kinozilien, BL = Basallamina, M = Muskelzellschicht, BG = Bindegewebe, G = Gefäße, SP/LU = Spermien bzw. Lumen

- = negativ, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

## 2.12. Bindungsstellen für *Triticum vulgare* Agglutinin s (WGAs)

Die Bindungsstellen mit WGAs treten in den Ductuli efferentes durch den stark positiv reagierenden apikalen Epithelsaum und die deutlich bis stark positiven Kinozilien in Erscheinung. Die Golgi-Zone der Hauptzellen und die Basallamina zeigen sich hier deutlich positiv. Im Initialsegment weisen die Stereozilien und der apikaler Epithelsaum eine deutlich positive Reaktion auf. Zudem reagieren die Golgi-Zone der Hauptzellen, die Basallamina und auch die Spermien im Lumen ebenfalls deutlich positiv. Die Basalzellen treten in diesem und auch in den beiden folgenden Segmenten durch eine stark positive Reaktion in Erscheinung. Im Mittelsegment sind dadurch die Zellausläufer der Basalzellen deutlich zu erkennen. Ebenfalls deutlich positiv zeigen sich die Golgi-Zone der Hauptzellen und der apikale Epithelsaum. Die Stereozilien hingegen weisen hier nur eine schwach positive Reaktion auf (Bild 28). Im Terminalsegment reagieren neben den Basalzellen auch die Stereozilien und die Spermien im Lumen stark positiv. Der apikale Epithelsaum ist deutlich positiv. Die Gefäße im Bindegewebe sind durchgehend schwach positiv zu erkennen.

Tabelle 18 Übersicht über die WGAs-Bindungsstellen

Segment	AES	HZ		BZ/ ZZ	SZ/ KZ	BL	M	BG	G	SP/ LU
		ZP	GZ							
D. eff.	+++	-	++	+	++	++	-	-	+	-
Initial	++	-	++	+++	++	++	+	+	+	++
Mittel	++	-	++	+++	+	-	-	-	+	++
Terminal	++	-	-	+++	+++	-	-	-	+	+++

AES = apikaler Epithelsaum, HZ = Hauptzelle, ZP = Zytoplasma, GZ = Golgi-Zone, BZ/ZZ = Basal-/Zilienzone, SZ/KZ = Stereozilien/Kinozilien, BL = Basallamina, M = Muskelzellschicht, BG = Bindegewebe, G = Gefäße, SP/LU = Spermien bzw. Lumen

- = negativ, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### 2.13. Bindungsstellen für *Ulex europaeus* I Agglutinin (UEA I)

Es sind keine UEA I-Bindungsstellen im Nebenhoden des Pferdes nachweisbar.

### 2.14. Bindungsstellen für *Phaseolus vulgaris* Erythroagglutinin (PHA-E)

Das Epithel der Ductuli efferentes zeigt im apikalen Bereich eine schwach positive Reaktion mit PHA-E. Ansonsten sind keine Bindungsstellen zu erkennen.

Tabelle 19 Übersicht über die PHA-E-Bindungsstellen

Segment	AES	HZ		BZ/ ZZ	SZ/ KZ	BL	M	BG	G	SP/ LU
		ZP	GZ							
D. eff.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Initial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mittel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terminal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AES = apikaler Epithelsaum, HZ = Hauptzelle, ZP = Zytoplasma, GZ = Golgi-Zone, BZ/ZZ = Basal-/Zilienzone, SZ/KZ = Stereozilien/Kinozilien, BL = Basallamina, M = Muskelzellschicht, BG = Bindegewebe, G = Gefäße, SP/LU = Spermien bzw. Lumen

- = negativ, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### 2.15. Bindungsstellen für *Phaseolus vulgaris* Leukoagglutinin (PHA-L)

Die Bindungsstellen für PHA-L liegen ausschließlich im Initialsegment des Nebenhodens. Der apikale Epithelsaum reagiert stark, die Stereozilien deutlich positiv. Zudem fallen schwach bis deutlich positive Zellfragmente im Lumen auf. Schwach positiv zeigt sich die Golgi-Zone der Hauptzellen (Bild 29).

Tabelle 20 Übersicht über die PHA-L-Bindungsstellen

Segment	AES	HZ		BZ/ ZZ	SZ/ KZ	BL	M	BG	G	SP/ LU
		ZP	GZ							
D. eff.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Initial	+++	-	+	-	++	-	-	-	-	+
Mittel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terminal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AES = apikaler Epithelsaum, HZ = Hauptzelle, ZP = Zytoplasma, GZ = Golgi-Zone, BZ/ZZ = Basal-/Zilienzelle, SZ/KZ = Stereozilien/Kinozilien, BL = Basallamina, M = Muskelzellschicht, BG = Bindegewebe, G = Gefäße, SP/LU = Spermien bzw. Lumen

- = negativ, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### 2.16. Bindungsstellen für *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA)

Bei der Inkubation mit SNA zeigt sich das Bindegewebe durchgehend schwach bis deutlich positiv, die darin gelegenen Gefäße deutlich positiv. In den Ductuli efferentes reagieren der apikale Epithelsaum und das Zytoplasma der Zilienzellen stark positiv. Die Kinozilien sind deutlich positiv (Bild 30). Hier und in allen Abschnitten des Nebenhodens sind die Spermien im Lumen schwach positiv angefärbt. Im Initialsegment weist der apikale Epithelsaum und die Stereozilien eine deutlich positive Reaktion auf. Ebenso deutlich positiv ist die Golgi-Zone der Hauptzellen hier zu erkennen. Die Basallamina stellt sich schwach positiv dar. Das Zytoplasma der Basalzellen zeigt sich im Initialsegment und auch in den beiden folgenden Abschnitten stark positiv. Im Mittelsegment sind die an die luminale Oberfläche reichenden Zellausläufer der Basalzellen am besten zu erkennen (Bild 31). Der apikale Epithelsaum reagiert im Terminalsegment genauso wie die Basallamina deutlich positiv. Die Stereozilien zeigen sich schwach positiv und die Basalzellen treten weiterhin stark positiv in Erscheinung.

Tabelle 21 Übersicht über die SNA-Bindungsstellen

Segment	AES	HZ		BZ/ ZZ	SZ/ KZ	BL	M	BG	G	SP/ LU
		ZP	GZ							
D. eff.	+++	-	-	+++	++	-	-	+	++	+
Initial	++	-	++	+++	++	+	-	+	++	+
Mittel	-	-	-	+++	-	-	-	++	++	+
Terminal	++	-	-	+++	+	++	-	++	++	+

AES = apikaler Epithelsaum, HZ = Hauptzelle, ZP = Zytoplasma, GZ = Golgi-Zone, BZ/ZZ = Basal-/Zilienzelle, SZ/KZ = Stereozilien/Kinozilien, BL = Basallamina, M = Muskelzellschicht, BG = Bindegewebe, G = Gefäße, SP/LU = Spermien bzw. Lumen

- = negativ, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

#### 2.17. Bindungsstellen für *Maackia amurensis* I Leukoagglutinin (MAA I)

Mit MAA I konnte keine positive Reaktion beobachtet werden.

#### 2.18. Bindungsstellen für *Viscum album* Agglutinin (VAA)

Bei der Untersuchung mit VAA traten keine positiven Reaktionen am Nebenhoden des Pferdes in Erscheinung.



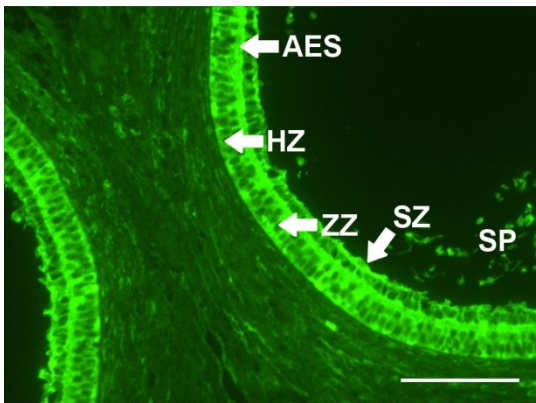


Bild 20 Ductuli efferentes, Con A-Bindung, SB = 50  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (AES), das Zytoplasma der Zilienzellen (ZZ), die Stereozilien (SZ) und die Spermien (SP) und Zellfragmente im Lumen reagieren stark positiv. Das Zytoplasma der Hauptzellen (HZ) zeigt sich deutlich positiv.

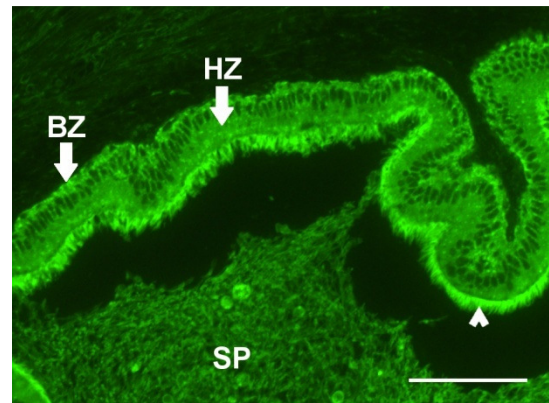


Bild 21 Terminalsegment, Con A-Bindung, SB = 50  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Basalzellen (BZ) und die Stereozilien (Pfeilspitze) reagieren stark positiv, das Zytoplasma der Hauptzellen (HZ) und die Spermien (SP) deutlich positiv.

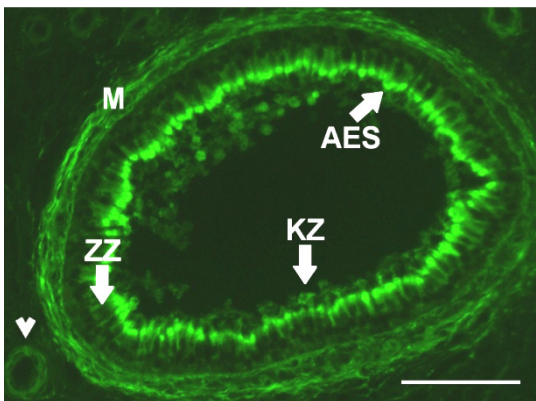


Bild 22 Ductuli efferentes, LCA-Bindung, SB = 50  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (AES) reagiert stark positiv. Die Muskelschicht (M) zeigt sich deutlich positiv. Die Kinozilien (KZ), das apikale Zytoplasma der Zilienzellen (ZZ) und die Gefäße (Pfeilspitze) sind schwach positiv.

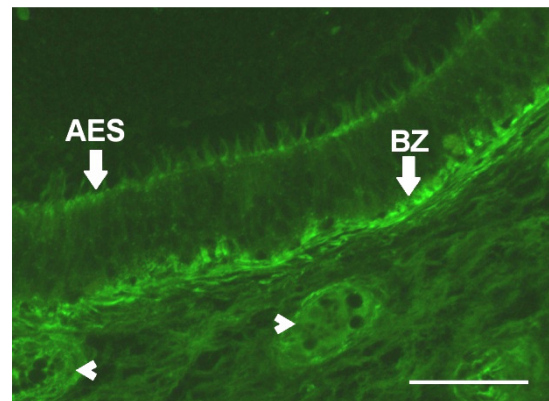


Bild 23 Mittelsegment, LCA-Bindung, SB = 50  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (AES) reagiert deutlich, das Zytoplasma der Basalzellen (BZ) stark positiv. Die Gefäße (Pfeilspitzen) zeigen sich schwach bis deutlich positiv.

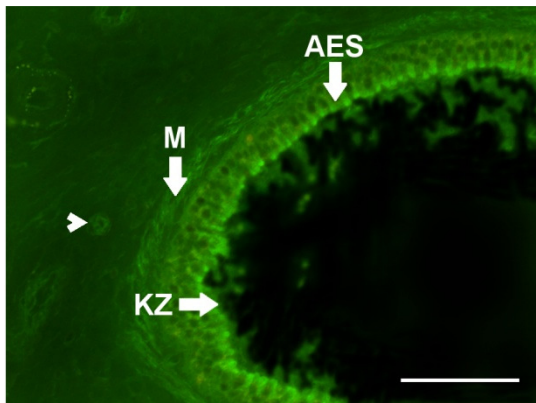


Bild 24 Ductuli efferentes, PSA-Bindung,  
SB = 50  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (AES) ist deutlich positiv. Die Kinozilien (KZ) und die Muskelschicht (M) stellen sich deutlich positiv, die Gefäße (Pfeilspitze) schwach positiv dar.

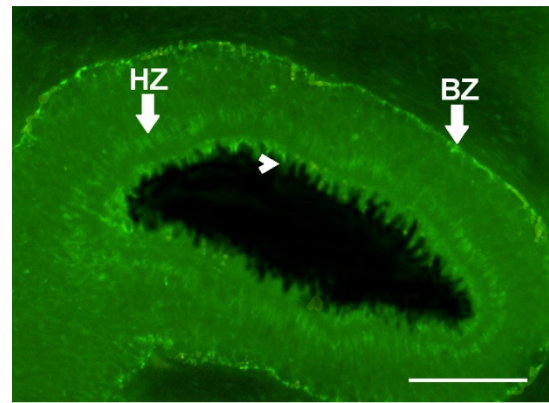


Bild 25 Mittelsegment, PSA-Bindung,  
SB = 50  $\mu$ m

Die Stereozilien (Pfeilspitze) sind wie die Golgi-Zone der Hauptzellen (HZ) schwach positiv. Die Basalzellen (BZ) reagieren stark positiv.

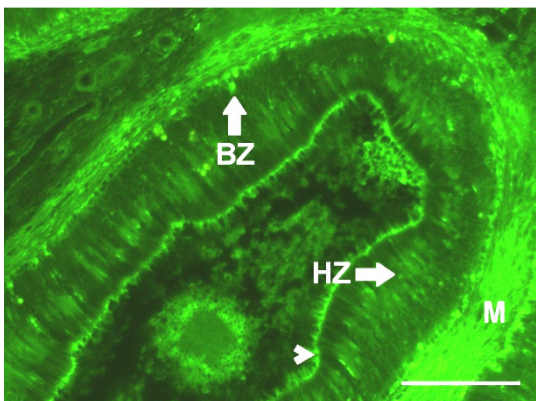


Bild 26 Initialsegment, WGA-Bindung,  
SB = 50  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) und die Basalzellen (BZ) reagieren stark positiv. Die Golgi-Zone der Hauptzellen (HZ) zeigt sich deutlich positiv und die Muskelschicht (M) ist deutlich bis stark positiv.

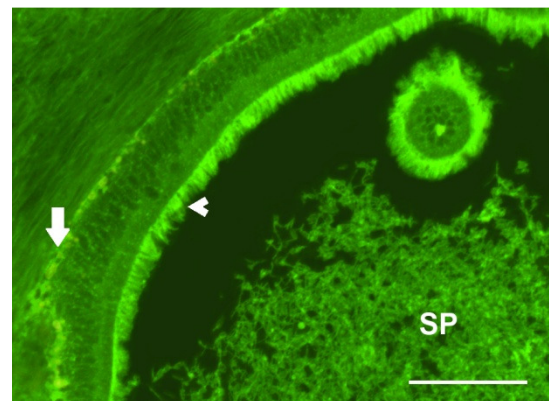


Bild 27 Terminalsegment, WGA-Bindung, SB = 50  $\mu$ m

Die Basalzellen (Pfeil) und die Stereozilien (Pfeilspitze) zeigen eine stark positive Reaktion. Die Spermien (SP) reagieren deutlich bis stark positiv.

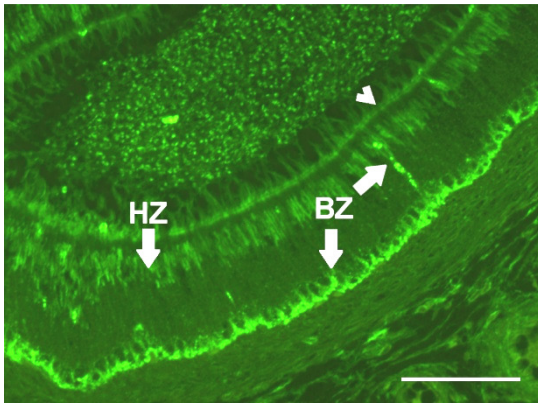


Bild 28 Mittelsegment, WGAs-Bindung,  
SB = 50  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) und die Golgi-Zone der Hauptzellen (HZ) reagieren deutlich positiv. Das Zytoplasma der Basalzellen (BZ) ist stark positiv, dadurch werden ihre Zellausläufer erkennbar.

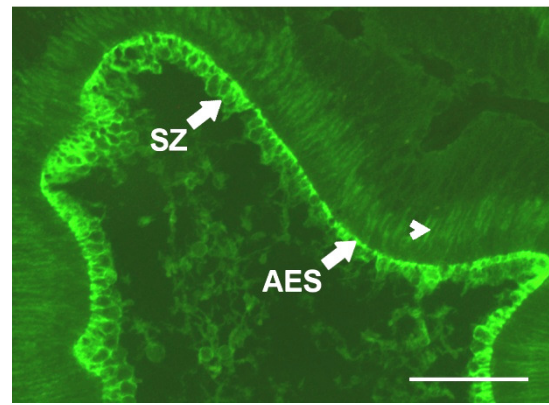


Bild 29 Initialsegment, PHA-L-Bindung,  
SB = 50  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (AES) ist stark, die Stereozilien (SZ) deutlich und die Golgi-Zone der Hauptzellen (Pfeilspitze) schwach positiv.

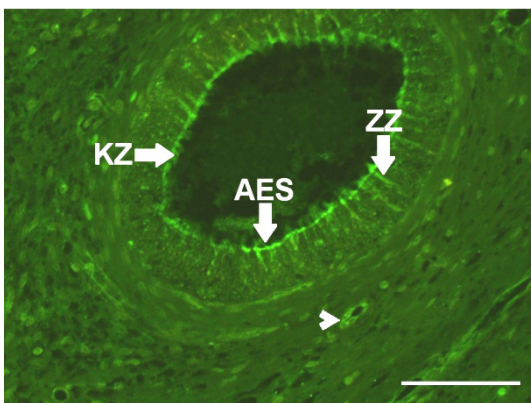


Bild 30 Ductuli efferentes, SNA-Bindung, SB = 50  $\mu$ m

Die Kinozilien (KZ) und die Gefäße (Pfeilspitze) reagieren deutlich, der apikale Epithelsaum (AES) und die Zilienzellen (ZZ) stark positiv.

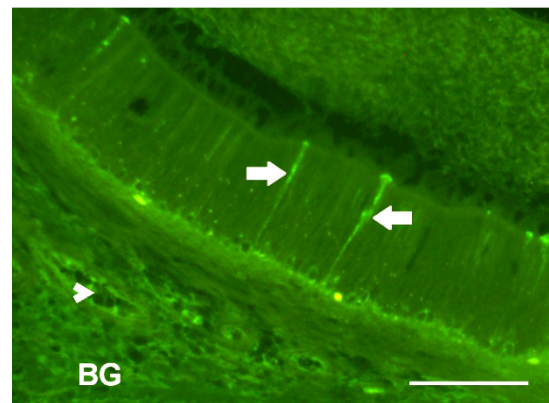


Bild 31 Mittelsegment, SNA-Bindung, SB = 50  $\mu$ m

Die Zellausläufer der Basalzellen (Pfeile) stellen sich durch eine stark positive Reaktion gut dar. Das Bindegewebe (BG) reagiert wie die Gefäße (Pfeilspitze) deutlich positiv.

### **3. Immunhistochemische Untersuchungen am Nebenhoden**

#### **3.1. Immunhistochemischer Nachweis von „ $\alpha$ -smooth-muscle-actin“**

Im gesamten Verlauf der Ductuli efferentes und des Ductus epididymidis zeigt das Epithel keine Reaktion mit dem Antikörper gegen „ $\alpha$ -smooth-muscle-actin“ ( $\alpha$ -SMA). Die umgebende Muskelzellschicht hingegen reagiert durchgehend stark immunpositiv. So hebt sich das Epithel deutlich von der Muskulatur ab (Bild 32 - 35). Deren nach distal zunehmende Stärke lässt sich gut darstellen (Bild 35). Auch die Tunica media der Gefäße im Bindegewebe zeigt in allen Abschnitten eine stark positive Immunreaktion (Bild 32 - 34).



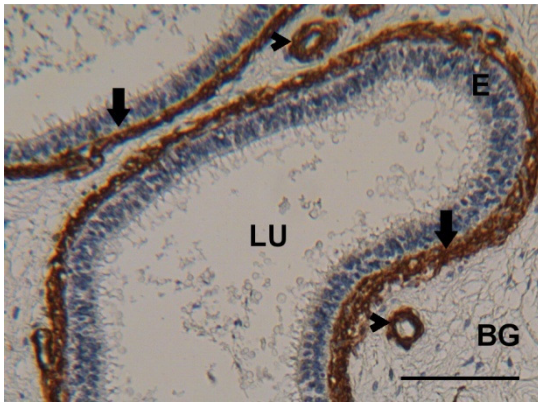


Bild 32 Ductuli efferentes, SMA-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Das Epithel (E) und der Inhalt des Lumens (LU) zeigen keine Reaktion. Die Muskelschicht (Pfeile) und die im Bindegewebe (BG) vorkommenden Gefäße (Pfeilspitzen) reagieren stark positiv.

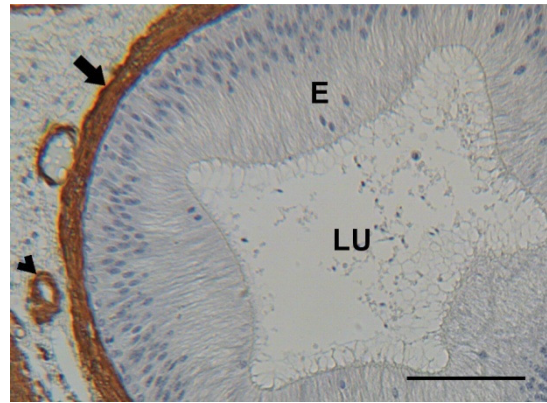


Bild 33 Initialsegment, SMA-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

LU = Lumen, E = Epithel, Pfeil = Muskelschicht, Pfeilspitze = Gefäße.

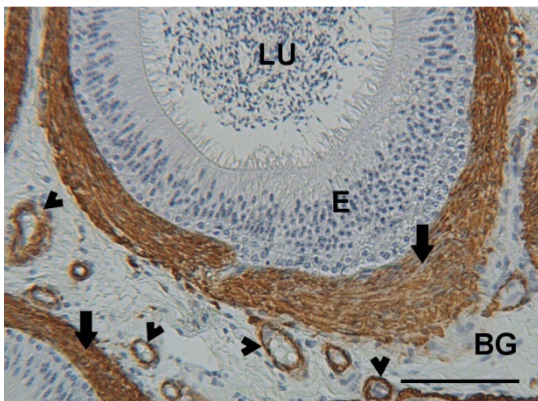


Bild 34 Mittelsegment, SMA-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

LU = Lumen, E = Epithel, BG = Bindegewebe, Pfeile = Muskelschicht, Pfeilspitzen = Gefäße.

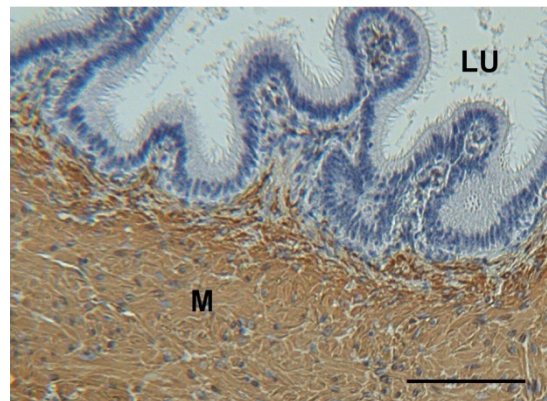


Bild 35 Terminalsegment, SMA-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Die Stärke der Muskelschicht (M) hat im Terminalsegment ihr Maximum.

LU = Lumen.

Tabelle 22 Immunhistochemischer Nachweis von  $\alpha$ -SMA

Zellart/Gewebeteil		Ductuli eff.	Initial- segment	Mittel- segment	Terminal- segment
Zilienzellen	Zytoplasma	-			
	Zellkern	-			
	Kinozilien	-			
Hauptzellen	Zytoplasma	-	-	-	-
	Zellkern	-	-	-	-
	Stereozilien/ Mikrovilli	-	-	-	-
Basalzellen	Zytoplasma		-	-	-
	Zellkern		-	-	-
Apikalzellen	Zytoplasma		-	-	
	Zellkern		-	-	
Lumen/Spermien		-	-	-	-
Apikaler Epithelsaum		-	-	-	-
Basallamina		-	-	-	-
Muskelschicht		+++	+++	+++	+++
Bindegewebe		-	-	-	-
Gefäße		+++	+++	+++	+++

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### **3.2. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin**

Während die Apikalzellen über den gesamten Nebenhodenverlauf und die Hauptzellen ausgenommen dem Terminalsegment ebenfalls immunonegativ erscheinen, reagiert das Zytoplasma der Basalzellen im Initial-, Mittel- und Terminalsegment zum Teil deutlich positiv mit dem Vimentin-Antikörper (Bild 37 - 39). So lassen sich an die luminale Oberfläche führende Zellausläufer der Basalzellen erkennen (Bild 37). Deutlich positive, in den Hauptzellen liegende Granula treten im Initial- und Mittelsegment in Erscheinung (Bild 38). Im Terminalsegment fällt ein stark positiver apikaler Epithelsaum auf. Zusätzlich reagiert das Zytoplasma der Hauptzellen schwach positiv (Bild 39). Die Basallamina weist eine positive Reaktion in allen Abschnitten vor. Außerhalb des Epithels zeigt die Muskulatur durchgehend eine deutliche positive Reaktion (Bild 36 - 38). Das Bindegewebe reagiert im Initial- und Mittelsegment deutlich positiv (Bild 37 und 38), in den Ductuli efferentes schwach positiv (Bild 36). Das Gefäßendothel zeigt durchgehend eine stark positive Reaktion mit dem Antikörper (Bild 36 - 38).

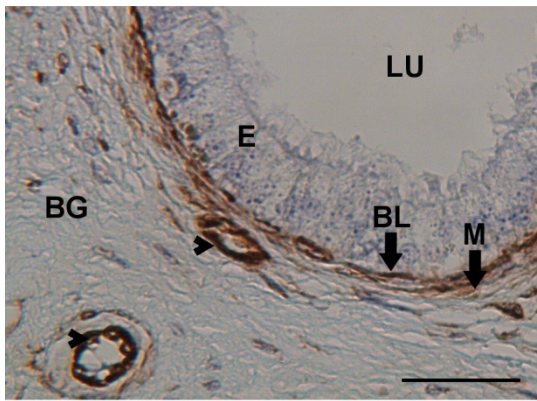


Bild 36 Ductuli efferentes, Vimentin-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Der Inhalt des Lumens (LU) und das Epithel (E) zeigen keine Reaktion. Die Gefäßendothelien (Pfeilspitzen) reagieren stark, die Muskulatur (M) deutlich positiv. Das Bindegewebe (BG) zeigt sich schwach positiv.

BL = Basallamina.

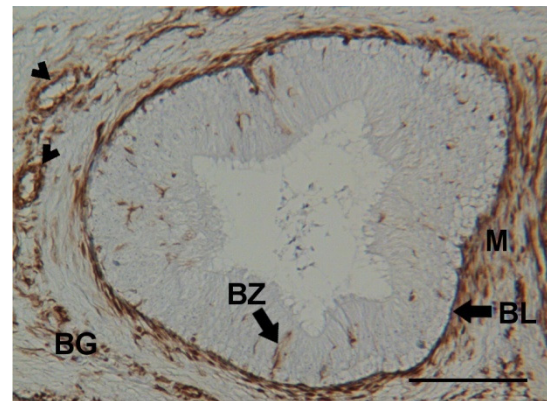


Bild 37 Initialsegment, Vimentin-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Die Muskelschicht (M), die Basallamina (BL) und das Gefäßendothel (Pfeilspitzen) reagieren wie in den Ductuli efferentes, das Bindegewebe (BG) zeigt sich dagegen deutlich positiv. Das wenige Zytoplasma der Basalzellen (BZ) weist zum Teil eine deutlich positive Reaktion auf, wodurch Zellausläufer erkennbar werden.



Bild 38 Mittelsegment, Vimentin-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Granula (GR) in den Hauptzellen reagieren deutlich positiv. Muskulatur (M), Bindegewebe (BG), Basallamina (BL), Basalzellen (BZ) und Gefäßendothel (Pfeilspitzen) zeigen sich wie im Initialsegment.

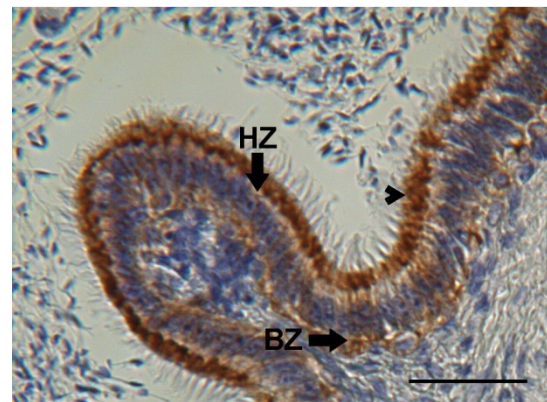


Bild 39 Terminalsegment, Vimentin-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) reagiert stark positiv. Das Zytoplasma der Basalzellen (BZ) zeigt sich weiterhin deutlich positiv, und das der Hauptzellen (HZ) weist im Terminalsegment eine schwach positive Reaktion auf.



Tabelle 23 Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Zellart/Gewebeteil		Ductuli eff.	Initial- segment	Mittel- segment	Terminal- segment
Zilienzellen	Zytoplasma	-			
	Zellkern	-			
	Kinozilien	-			
Hauptzellen	Zytoplasma	-	-	-	+
	Zellkern	-	-	-	-
	Stereozilien/ Mikrovilli	-	-	-	-
Basalzellen	Zytoplasma		++	++	++
	Zellkern		-	-	-
Apikalzellen	Zytoplasma		-	-	
	Zellkern		-	-	
Lumen/Spermien		-	-	-	-
Apikaler Epithelsaum		-	-	-	+++
Basallamina		++	++	++	++
Muskelschicht		++	++	++	++
Bindegewebe		+	++	++	-
Gefäße		+++	+++	+++	+++

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### **3.3. Immunhistochemischer Nachweis von Laminin**

Die Bindungsstellen für den Laminin-Antikörper befinden sich hauptsächlich in den Basalmembranen. Sowohl die Basallamina des Epithels reagiert deutlich bis stark positiv, als auch die der Gefäße zeigt sich stark positiv in allen Abschnitten. Im gesamten Nebenhodenverlauf reagieren die einzelnen Schichten der Muskulatur deutlich bis starke immunpositiv (Bild 40 - 43). Zudem färbt sich der apikale Epithelsaum der Ductuli efferentes und des Terminalsegments schwach positiv an (Bild 40 und 43). Das apikale Zytoplasma der Hauptzellen reagiert im Terminalsegment ebenfalls schwach positiv (Bild 43).

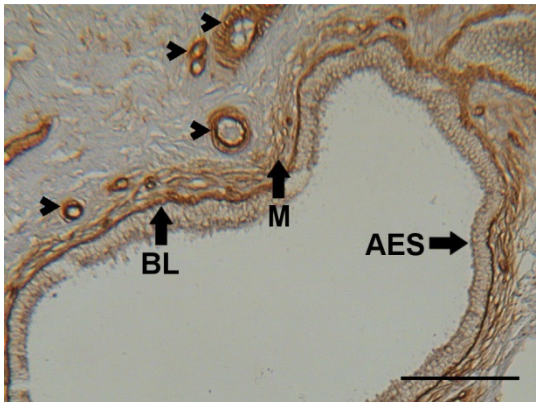


Bild 40 Ductuli efferentes, Laminin-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Die Basallamina (BL), die Muskelschicht (M) und die Gefäße (Pfeilspitzen) reagieren stark positiv. Der apikale Epithelsaum (AES) zeigt sich schwach positiv.

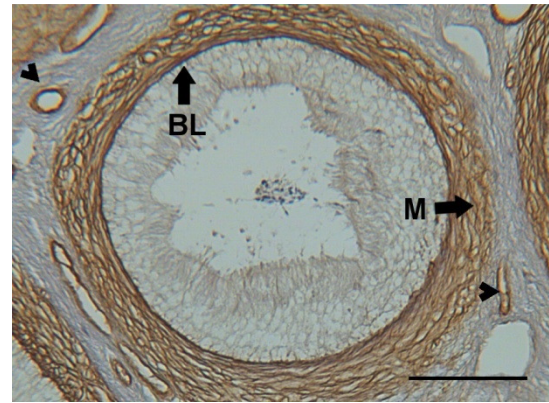


Bild 41 Initialsegment, Laminin-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Die Basallamina (BL), die Muskulatur (M) und die Gefäße (Pfeilspitzen) zeigen sich stark immunopositiv.

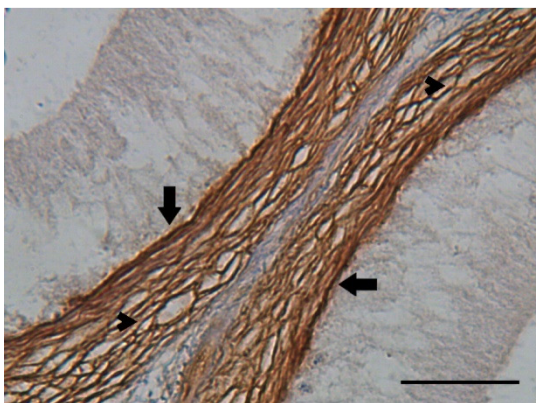


Bild 42 Mittelsegment, Laminin-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Stark positive Reaktion der Basallamina (Pfeile) und der Muskelschicht (Pfeilspitzen) sind zu erkennen.

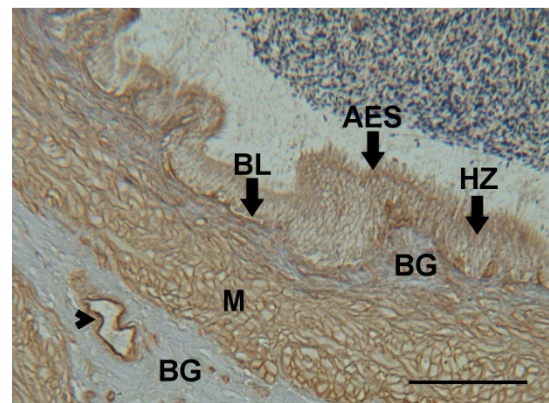


Bild 43 Terminalsegment, Laminin-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Die Gefäße (Pfeilspitze) sind weiterhin stark positiv. Die Muskulatur (M) und die Basallamina (BL) reagieren nur mehr deutlich positiv. Zusätzlich zeigen sich der apikale Epithelsaum (AES) und das apikale Zytoplasma der Hauptzellen (HZ) schwach immunopositiv.

BG = Bindegewebe.

Tabelle 24 Immunhistochemischer Nachweis von Laminin

Zellart/Gewebeteil		Ductuli eff.	Initial- segment	Mittel- segment	Terminal- segment
Zilienzellen	Zytoplasma	-			
	Zellkern	-			
	Kinozilien	-			
Hauptzellen	Zytoplasma	-	-	-	+
	Zellkern	-	-	-	-
	Stereozilien/ Mikrovilli	-	-	-	-
Basalzellen	Zytoplasma		-	-	-
	Zellkern		-	-	-
Apikalzellen	Zytoplasma		-	-	
	Zellkern		-	-	
Lumen/Spermien		-	-	-	-
Apikaler Epithelsaum		+	-	-	+
Basallamina		+++	+++	+++	++
Muskelschicht		+++	+++	+++	++
Bindegewebe		-	-	-	-
Gefäße		+++	+++	+++	+++

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### **3.4. Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin**

Die zilientragenden Epithelzellen der Ductuli efferentes zeigen eine stark positive Reaktion mit dem Panzytokeratin-Antikörper im gesamten Zytoplasma, nicht jedoch an den Kinozilien (Bild 44). Die Basalzellen reagieren im Initial- und Mittelsegment stark, im Terminalsegment deutlich positiv (Bild 45 - 47). Die bis ans Lumen reichenden Zellausläufer der Basalzellen werden deutlich erkennbar (Bild 46). Eine schwach positive Reaktion auf den Antikörper zeigt das apikale Zytoplasma der Hauptzellen im Terminalsegment. Hier reagiert der apikale Epithelsaum stark positiv (Bild 47). Außerhalb des Epithels weisen alle Strukturen eine negative Reaktion auf.

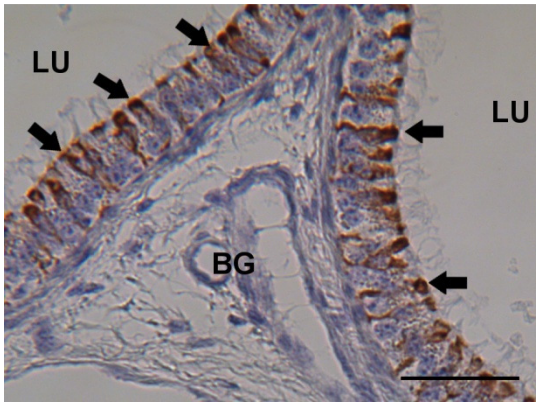


Bild 44 Ductuli efferentes, Panzytokeratin-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Zilienzellen (Pfeile) ist stark positiv. Das Bindegewebe (BG) und der Inhalt des Lumens (LU) bleiben immunonegativ.

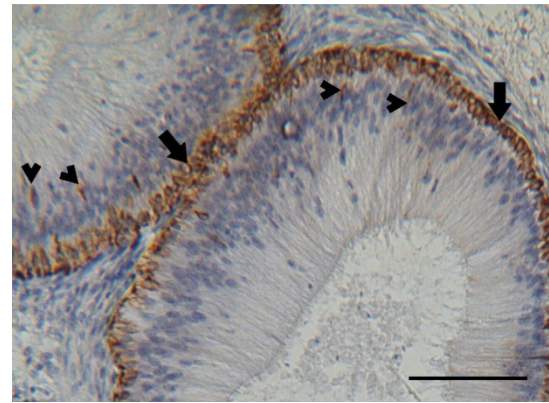


Bild 45 Initialsegment, Panzytokeratin-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Die Basalzellen (Pfeile) und ihre Zellausläufer (Pfeilspitzen) zeigen sich stark positiv.

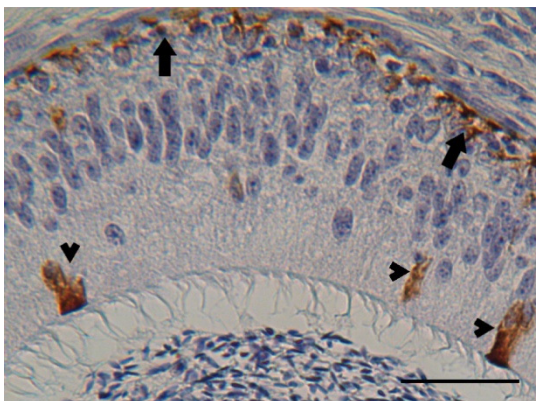


Bild 46 Mittelsegment, Panzytokeratin-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Durch die stark positive Reaktion des Zytoplasmas der Basalzellen (Pfeile) werden ihre Zellausläufer (Pfeilspitzen) sehr gut darstellbar.



Bild 47 Terminalsegment, Panzytokeratin-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (AES) reagiert stark positiv, das Zytoplasma der Basalzellen (BZ) deutlich positiv und das der Hauptzellen (HZ) schwach positiv.

Tabelle 25 Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin

Zellart/Gewebeteil		Ductuli eff.	Initial- segment	Mittel- segment	Terminal- segment
Zilienzellen	Zytoplasma	+++			
	Zellkern	-			
	Kinozilien	-			
Hauptzellen	Zytoplasma	-	-	-	+
	Zellkern	-	-	-	-
	Stereozilien/ Mikrovilli	-	-	-	-
Basalzellen	Zytoplasma		+++	+++	++
	Zellkern		-	-	-
Apikalzellen	Zytoplasma		-	-	
	Zellkern		-	-	
Lumen/Spermien		-	-	-	-
Apikaler Epithelsaum		-	-	-	+++
Basallamina		-	-	-	-
Muskelschicht		-	-	-	-
Bindegewebe		-	-	-	-
Gefäße		-	-	-	-

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### **3.5. Immunhistochemischer Nachweis der Cytokeratine**

#### **3.5.1. Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 5**

Im Epithel der Ductuli efferentes reagiert das Zytoplasma der Zilienzellen stark positiv mit dem Cytokeratin 5-Antikörper. Das Zytoplasma der Hauptzellen und die dünne Muskelschicht reagieren hier schwach positiv (Bild 48). In den folgenden drei Nebenhodensegmenten reagieren die Basalzellen stark positiv, sodass sich ihre Zellausläufer mit deutlicher Abgrenzung zu den Hauptzellen darstellen lassen. Im Initial-, Mittel- und Terminalsegment ist das Zytoplasma der Hauptzellen deutlich, ihre Stereozilien schwach immunpositiv (Bild 49 - 51). Die Apikalzellen reagieren identisch zu den Hauptzellen. Der apikale Epithelsaum färbt sich im Initialsegment schwach bis deutlich, im Terminalsegment deutlich braun (Bild 51). Die das Epithel umgebende Muskelschicht reagiert durchgehend schwach (Bild 48, 49 und 51), die Gefäße im Bindegewebe stark auf den Antikörper (Bild 49 und 50).



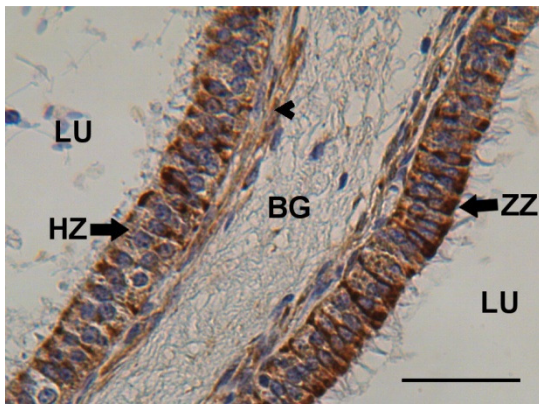


Bild 48 Ductuli efferentes, CK 5-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Zilienzellen (ZZ) reagiert stark positiv, das der Hauptzellen (HZ) dagegen schwach positiv. Die Muskelschicht (Pfeilspitze) weist ebenfalls nur eine schwach positive Reaktion auf. Lumen (LU) und Bindegewebe (BG) bleiben immunnegativ.

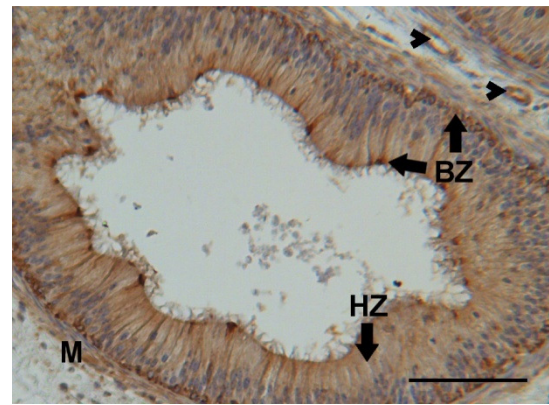


Bild 49 Initialsegment, CK 5-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Basalzellen (BZ) reagiert stark positiv. So kann man ihre Zellausläufer zwischen dem deutlich positiven Hauptzellen (HZ) erkennen. Die Gefäße (Pfeilspitzen) zeigen ebenfalls eine stark positive Reaktion. Die Muskelschicht (M) reagiert schwach positiv.



Bild 50 Mittelsegment, CK 5-Mittelsegment, SB = 100  $\mu$ m

Die Gefäße (Pfeilspitzen) reagieren wie die Basalzellen (BZ) stark positiv. Das Zytoplasma der Hauptzellen (HZ) zeigt sich deutlich positiv.

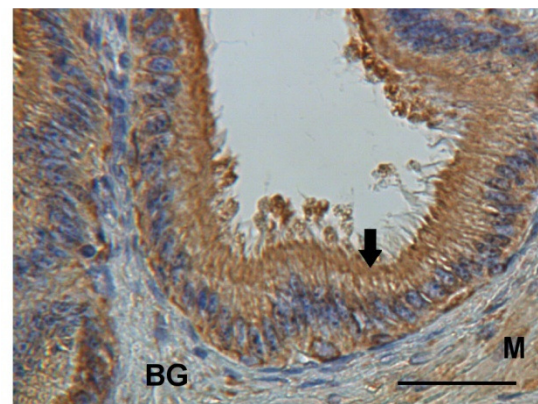


Bild 51 Terminalsegment, CK 5-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (Pfeil) reagiert deutlich positiv. Da Bindegewebsschicht (BG) negativ reagiert, wird sie gegenüber der schwach positiven Muskulatur (M) deutlich erkennbar.

Tabelle 26 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 5

Zellart/Gewebeteil		Ductuli eff.	Initial- segment	Mittel- segment	Terminal- segment
Zilienzellen	Zytoplasma	+++			
	Zellkern	-			
	Kinozilien	-			
Hauptzellen	Zytoplasma	+	++	++	++
	Zellkern	-	-	-	-
	Stereozilien/ Mikrovilli	-	+	+	+
Basalzellen	Zytoplasma		+++	+++	+++
	Zellkern		-	-	-
Apikalzellen	Zytoplasma		++	++	
	Zellkern		-	-	
Lumen/Spermien		-	-	-	-
Apikaler Epithelsaum		-	+	-	++
Basallamina		-	-	-	-
Muskelschicht		+	+	+	+
Bindegewebe		-	-	-	-
Gefäße		+++	+++	+++	+++

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### **3.5.2. Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 7**

Beim Nachweis von Cytokeratin 7 ist in keinem Abschnitt eine positive Reaktion feststellbar.

### **3.5.3. Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 8**

Die Reaktion mit dem Cytokeratin 8-Antikörper findet vor allem in den Basalzellen statt. Das Zytoplasma der Zilienzellen (Bild 52) und das der Basalzellen, sowie deren Zellkerne zeigen sich im gesamten Verlauf stark positiv (Bild 53 - 55). Die Basallamina ist ebenfalls durchgehend deutlich bis stark immunpositiv (Bild 52 - 55). Das Zytoplasma der Hauptzellen reagiert nur in den Ductuli efferentes um im Terminalsegment auf den Antikörper mit einer deutlich positiven Färbung (Bild 52 und 55). In den anderen beiden Abschnitten ist keine Reaktion der Hauptzellen zu erkennen (Bild 53 und 54). Ihre Stereozilien zeigen im Initial- und Mittelsegment keine, im Terminalsegment eine schwache Reaktion mit dem Cytokeratin 8-Antikörper. Stark immunpositiv ist der apikale Epithelsaum in den Ductuli efferentes und im Terminalsegment (Bild 52 und 55). Die außerhalb des Epithels liegenden Strukturen und der Lumeninhalt reagieren durchgehend immunnegativ.

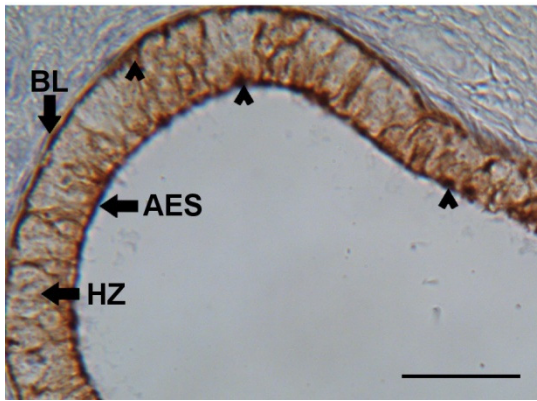


Bild 52 Ductuli efferentes, CK 8-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (AES), die Basallamina (BL) und das Zytoplasma der Zilienzellen (Pfeilspitzen) zeigen eine stark positive Reaktion. Das Zytoplasma der Hauptzellen (HZ) reagiert deutlich positiv.

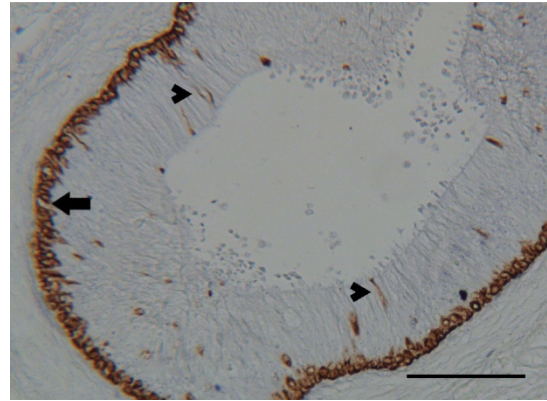


Bild 53 Initialsegment, CK 8-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Die Basalzellen (Pfeil) und ihre Zellausläufer (Pfeilspitzen) reagieren stark positiv.

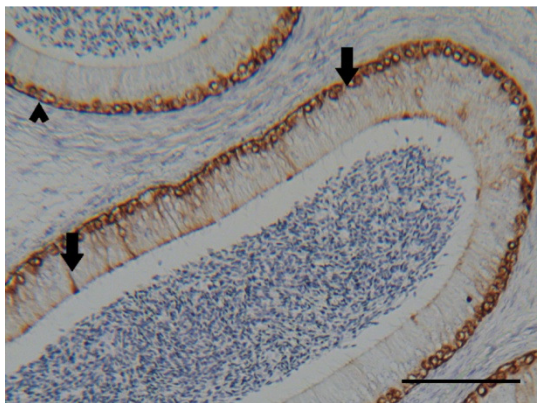


Bild 54 Mittelsegment, CK 8-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Sowohl die Basalzellen mit ihren Zellausläufern zur luminalen Oberfläche (Pfeile) als auch die Basallamina (Pfeilspitze) reagieren stark positiv.

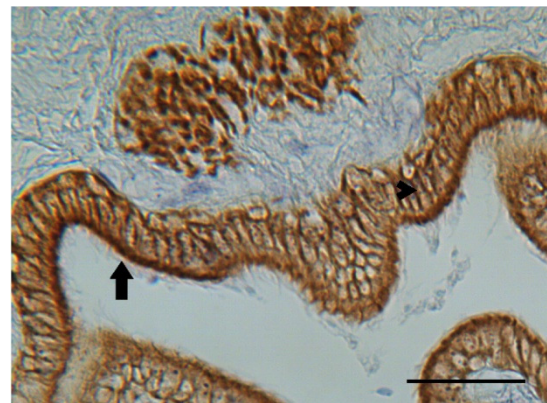


Bild 55 Terminalsegment, CK 8-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (Pfeil) ist stark positiv, die Hauptzellen (Pfeilspitze) deutlich positiv.

Tabelle 27 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 8

Zellart/Gewebeteil		Ductuli eff.	Initial- segment	Mittel- segment	Terminal- segment
Zilienzellen	Zytoplasma	+++			
	Zellkern	-			
	Kinozilien	-			
Hauptzellen	Zytoplasma	++	-	-	++
	Zellkern	-	-	-	-
	Stereozilien/ Mikrovilli	-	-	-	+
Basalzellen	Zytoplasma		+++	+++	+++
	Zellkern		+++	+++	+++
Apikalzellen	Zytoplasma		-	-	
	Zellkern		-	-	
Lumen/Spermien		-	-	-	-
Apikaler Epithelsaum		+++	-	-	+++
Basallamina		+++	+++	+++	++
Muskelschicht		-	-	-	-
Bindegewebe		-	-	-	-
Gefäße		-	-	-	-

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

#### **3.5.4. Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 14**

Bei dem Nachweis von Cytokeratin 14 im Nebenhoden des Pferdes zeigen sich die Zilienzellen in den Ductuli efferentes und die Basalzellen im gesamten Nebenhodengang stark positiv. Dabei färbt sich sowohl der Basalzellkern, als auch das Zytoplasma an (Bild 56 - 59). Das Zytoplasma der Hauptzellen reagiert schwach positiv in den Ductuli efferentes (Bild 56). Während sich das apikale Zytoplasma der Hauptzellen im Mittel- und Terminalsegment schwach bis deutlich anfärbt, zeigt es keine Reaktion im Initialsegment. Bei der Reaktion mit diesem Antikörper weist der apikale Epithelsaum im Terminalsegment eine starke Reaktion auf (Bild 59). Die Muskelschicht reagiert in den Ductuli efferentes und dem Initialsegment sehr schwach, im Mittel- deutlich und Terminalsegment schwach positiv. Während das Bindegewebe außerhalb des Epithels keine Reaktion auf den Cytokeratin 14-Antikörper vorweist, sind die Blutgefäße schwach bis deutlich positiv (Bild 56).



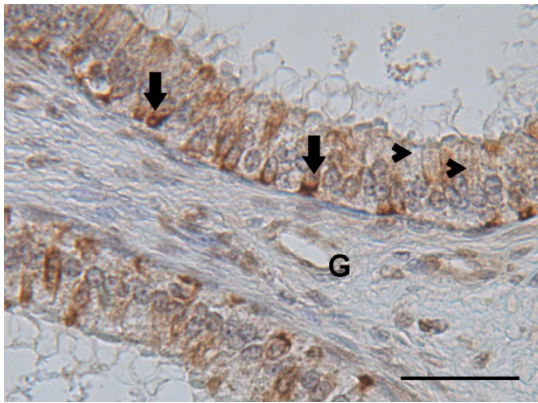


Bild 56 Ductuli efferentes, CK 14-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Zilienzellen (Pfeile) reagiert stark positiv, das der Hauptzellen (Pfeilspitzen) schwach positiv. Die Gefäße (G) sind schwach bis deutlich positiv gefärbt.

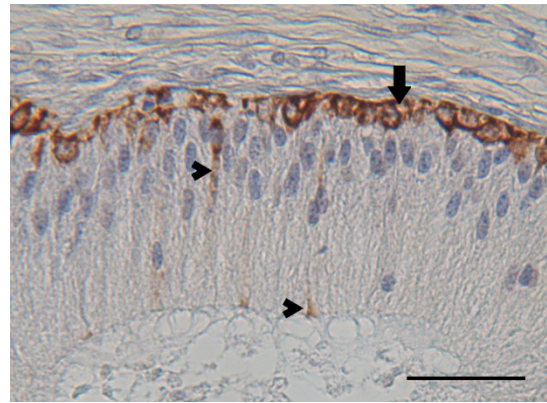


Bild 57 Initialsegment, CK 14-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Die Basalzellen (Pfeil) reagieren stark positiv, dadurch sind ihre Zellausläufer (Pfeilspitzen) gut erkennbar.

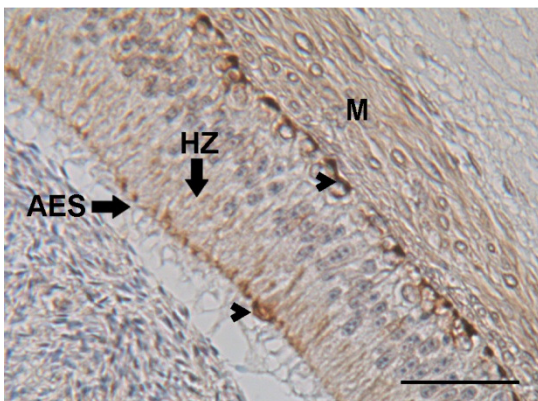


Bild 58 Mittelsegment, CK 14-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (AES) zeigt sich ebenso wie das apikale Zytoplasma der Hauptzellen (HZ) und die Muskelschicht (M) deutlich positiv. Die Basalzellen (Pfeilspitzen) reagieren weiterhin stark positiv.

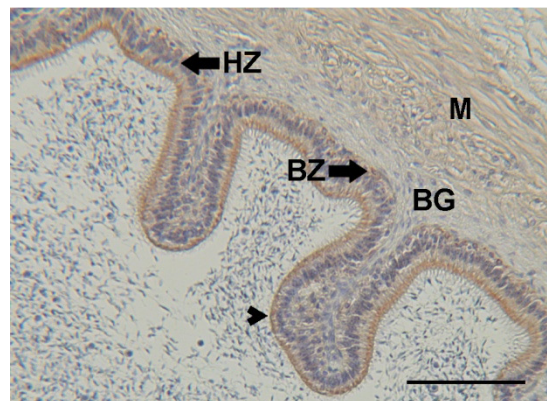


Bild 59 Terminalsegment, CK 14-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Die Muskelschicht (M) und das apikale Zytoplasma der Hauptzellen (HZ) reagieren schwach positiv. Die Basalzellen (BZ) und der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) reagieren stark positiv. Das Bindegewebe (BG) zwischen Muskulatur und Epithel reagiert nicht mit dem Antikörper.

Tabelle 28 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 14

Zellart/Gewebeteil		Ductuli eff.	Initial- segment	Mittel- segment	Terminal- segment
Zilienzellen	Zytoplasma	+++			
	Zellkern	-			
	Kinozilien	-			
Hauptzellen	Zytoplasma	+	-	++	+
	Zellkern	-	-	-	-
	Stereozilien/ Mikrovilli	-	-	-	-
Basalzellen	Zytoplasma		+++	+++	+++
	Zellkern		++	++	++
Apikalzellen	Zytoplasma		-	-	
	Zellkern		-	-	
Lumen/Spermien		-	-	-	-
Apikaler Epithelsaum		-	-	-	+++
Basallamina		-	-	-	-
Muskelschicht		+	+	++	+
Bindegewebe		-	-	-	-
Gefäße		+	++	+	++

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv



### **3.5.5. Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 18**

In den Ductuli efferentes reagiert sowohl das Zytoplasma der Kinozilientragenden Zellen als auch das der Hauptzellen deutlich bis stark positiv. Der apikale Epithelsaum zeigt eine stark positive Reaktion auf den Antikörper gegen das Cytokeratin 18. Die übrigen Gewebeanteile, mit Ausnahme der schwach positiven Gefäße, verhalten sich in diesem Abschnitt negativ (Bild 60). Während der Zellkern der Basalzellen im Verlauf des Nebenhodengangs eine durchgängig starke Reaktion auf den Antikörper zeigt, reagiert das Zytoplasma dieser Zellen unterschiedlich. Im Initialsegment ist es stark (Bild 61), im Mittelsegment schwach (Bild 62) und im Terminalsegment deutlich positiv (Bild 63). Die Hauptzellen verhalten sich im Initial- und Mittelsegment schwach, im Terminalsegment dann deutlich positiv. Eine deutliche Reaktion auf den Cytokeratin 18-Antikörper weist der apikale Epithelsaum im Initialsegment auf (Bild 61). Im Mittelsegment reagiert er nur schwach um sich im Terminalsegment wieder stark positiv darzustellen (Bild 62 und 63). Die Reaktion der Muskulatur ist in den Ductuli efferentes als negativ, im Initial- und Mittelsegment als schwach positiv und Terminalsegment als deutlich positiv einzustufen. Die im immunonegativen Bindegewebe liegenden Gefäße zeigen sich durchgehend schwach positiv (Bild 62).

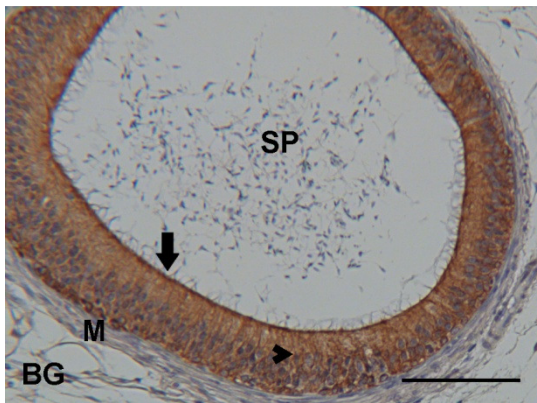


Bild 60 Ductuli efferentes, CK 18-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Während Spermien (SP), Muskelschicht (M) und Bindegewebe (BG) negativ reagieren, ist der apikale Epithelsaum (Pfeil) stark und das Zytoplasma der Epithelzellen (Pfeilspitze) deutlich bis stark positiv.

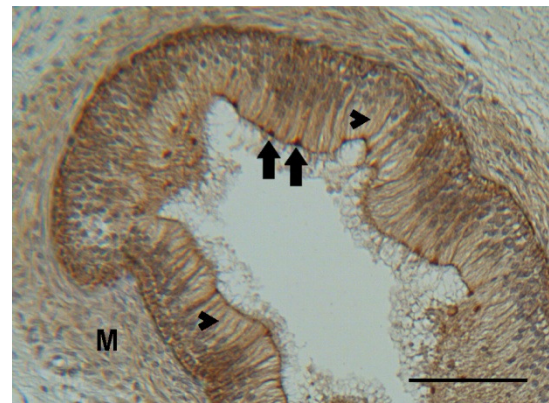


Bild 61 Initialsegment, CK 18-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Die stark positiven Zellausläufer der Basalzellen (Pfeile) sind neben dem nur schwach positiven Zytoplasma der Hauptzellen (Pfeilspitzen) gut zu erkennen. Die Muskelschicht (M) zeigt sich ebenfalls schwach positiv.

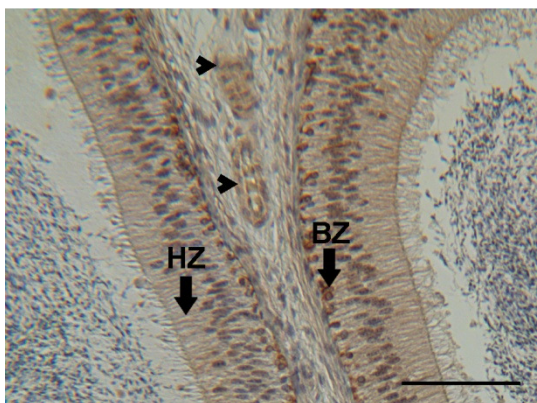


Bild 62 Mittelsegment, CK 18-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Der Zellkern der Basalzellen (BZ) ist weiterhin stark, deren Zytoplasma nur schwach positiv. Das Zytoplasma der Hauptzellen (HZ) ist ebenfalls schwach positiv. Die Gefäße (G) zeigen sich schwach positiv gefärbt.

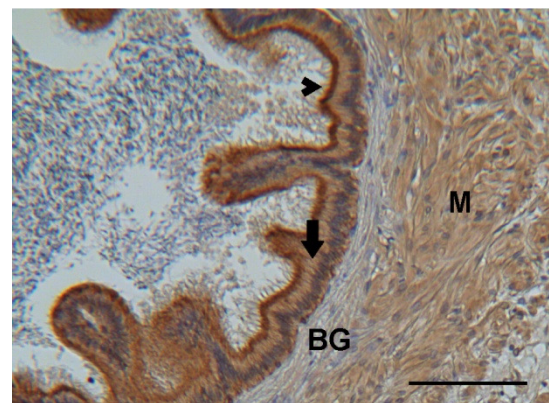


Bild 63 Terminalsegment, CK 18-Nachweis, SB = 100  $\mu$ m

Der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) reagiert stark positiv. Das Zytoplasma der Epithelzellen (Pfeil) und auch die Muskulatur (M) zeigen sich deutlich positiv. Das Bindegewebe (BG) ist negativ.

Tabelle 29 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 18

Zellart/Gewebeteil		Ductuli eff.	Initial- segment	Mittel- segment	Terminal- segment
Zilienzellen	Zytoplasma	+++			
	Zellkern	+++			
	Kinozilien	-			
Hauptzellen	Zytoplasma	+++	+	+	++
	Zellkern	-	-	-	-
	Stereozilien/ Mikrovilli	-	-	-	-
Basalzellen	Zytoplasma		+	+	++
	Zellkern		+++	+++	+++
Apikalzellen	Zytoplasma		+	+	
	Zellkern		-	-	
Lumen/Spermien		-	-	-	-
Apikaler Epithelsaum		+++	++	+	+++
Basallamina		-	-	-	-
Muskelschicht		-	+	+	++
Bindegewebe		-	-	-	-
Gefäße		+	+	+	+

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### **3.5.6. Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 19**

Mit dem Antikörper gegen Cytokeratin 19 sind stark positive Zilienzellen in den Ductuli efferentes und stark positive Basalzellen in den drei Segmenten des equinen Nebenhodengangs zu erkennen (Bild 64 - 67). So lassen sich die bis an die luminale Oberfläche reichenden Zellausläufer der Basalzellen darstellen. Im Initial- und Mittelsegment färbt sich neben dem stark braunen Zytoplasma der Basalzellen auch noch deren Kern schwach positiv an (Bild 65 und 66). Im Terminalsegment reagiert auch der apikale Epithelsaum stark positiv. Das Zytoplasma der Hauptzellen weist hier eine schwache bis deutliche Reaktion mit dem Antikörper auf (Bild 67). Die übrigen Epithelstrukturen und Gewebearten verhalten sich konstant negativ auf den Antikörper gegen das Cytokeratin 19.

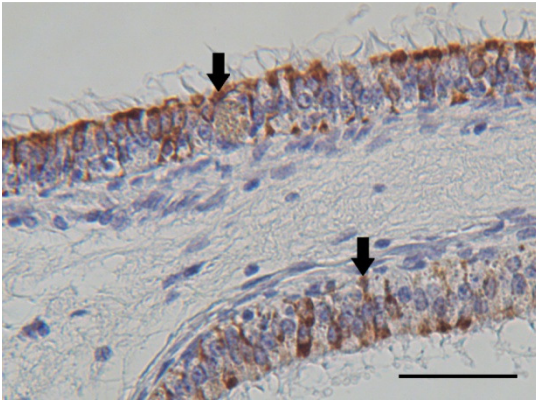


Bild 64 Ductuli efferentes, CK 19-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Zilienzellen (Pfeile) ist stark positiv.

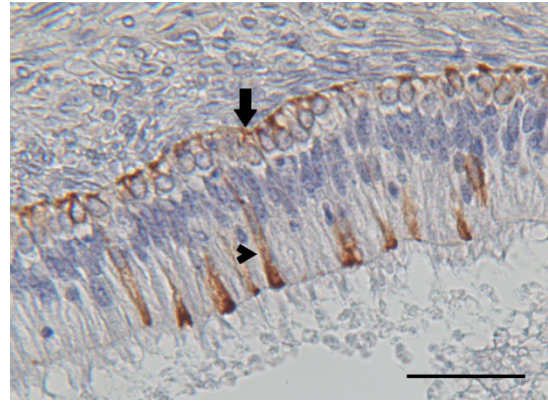


Bild 65 Initialsegment, CK 19-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Basalzellen ist stark positiv, wodurch sich ihre Zellausläufer (Pfeilspitze) gut darstellen. Der Kern der Basalzellen (Pfeil) färbt sich schwach positiv.

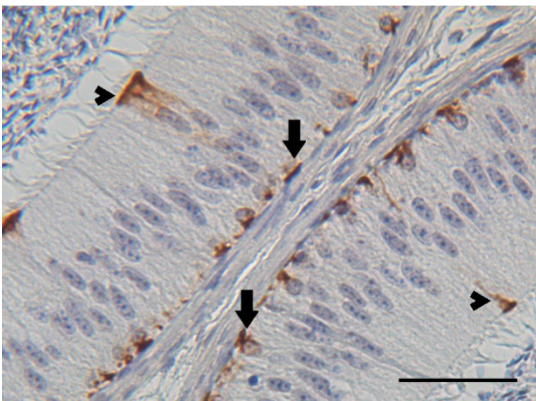


Bild 66 Mittelsegment, CK 19-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Basalzellen zeigt sich stark positiv. Die Zellausläufer (Pfeilspitzen) sind deutlich erkennbar. Die Kerne der Basalzellen (Pfeile) sind schwach positiv gefärbt.

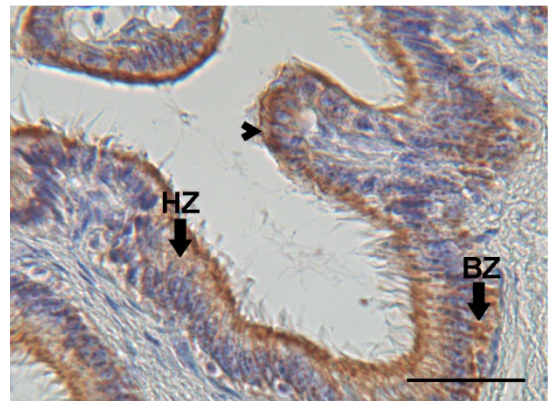


Bild 67 Terminalsegment, CK 19-Nachweis, SB = 40  $\mu$ m

Neben dem Zytoplasma der Basalzellen (BZ) reagiert hier auch der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) stark positiv. Das Zytoplasma der Hauptzellen (HZ) ist schwach bis deutlich positiv.

Tabelle 30 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 19

Zellart/Gewebeteil		Ductuli eff.	Initial- segment	Mittel- segment	Terminal- segment
Zilienzellen	Zytoplasma	+++			
	Zellkern	-			
	Kinozilien	-			
Hauptzellen	Zytoplasma	-	-	-	+
	Zellkern	-	-	-	-
	Stereozilien/ Mikrovilli	-	-	-	-
Basalzellen	Zytoplasma		+++	+++	+++
	Zellkern		+	+	-
Apikalzellen	Zytoplasma		-	-	
	Zellkern		-	-	
Lumen/Spermien		-	-	-	-
Apikaler Epithelsaum		-	-	-	+++
Basallamina		-	-	-	-
Muskelschicht		-	-	-	-
Bindegewebe		-	-	-	-
Gefäße		-	-	-	-

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

### **3.6. Immunhistochemischer Nachweis der Cyclooxygenase (COX) I**

In den Ductuli efferentes reagiert mit dem Cyclooxygenase I-Antikörper das Zytoplasma der Zilienzellen schwach positiv (Bild 68). Im Initialsegment zeigt das Zytoplasma der Basalzellen zum Teil eine stark positive Reaktion, das restliche Epithel reagiert nicht mit dem Antikörper (Bild 69). Im Mittel- und Terminalsegment reagieren die Basalzellen schwach bis deutlich immunpositiv (Bild 70 und 71). In den Ductuli efferentes und in allen Abschnitten des Ductus epididymidis zeigen sich die Gefäße im Bindegewebe mit einer stark positiven Reaktion (Bild 68, 70 und 71). Die Muskulatur und das Bindegewebe bleiben konstant negativ (Bild 71).



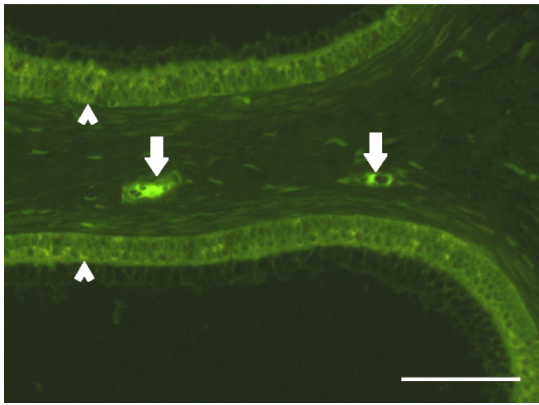


Bild 68 Ductuli efferentes, COX I-Nachweis, SB = 50  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Zilienzellen (Pfeilspitzen) reagiert schwach positiv. Die Gefäße (Pfeil) zeigen eine stark positive Reaktion.

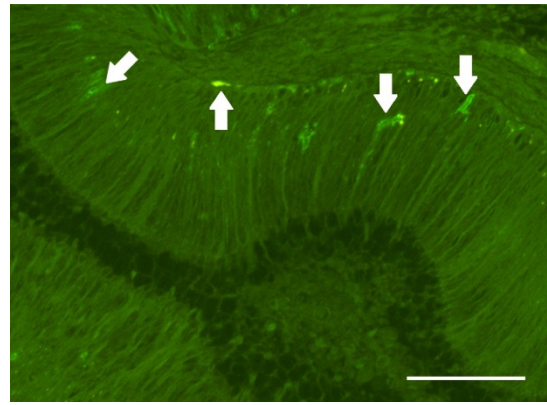


Bild 69 Initialsegment, COX I-Nachweis, SB = 50  $\mu$ m

Es reagiert nur das Zytoplasma der Basalzellen (Pfeile) stark positiv.

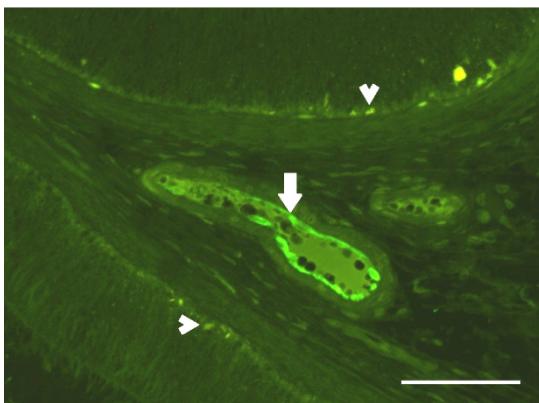


Bild 70 Mittelsegment, COX I-Nachweis, SB = 50  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Basalzellen (Pfeilspitzen) ist schwach bis deutlich positiv. Die Gefäße (Pfeil) reagieren stark positiv.

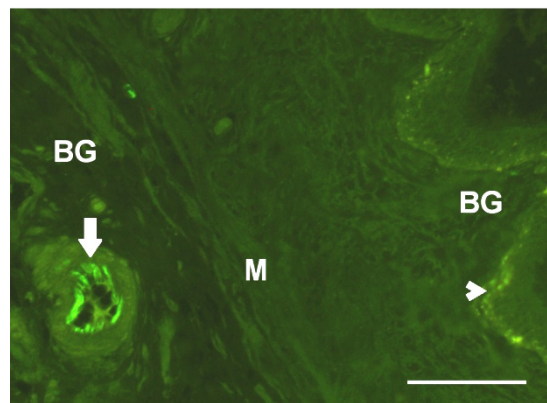


Bild 71 Terminalsegment, COX I-Nachweis, SB = 50  $\mu$ m

Die Gefäße (Pfeil) reagieren wie in den vorhergehenden Abschnitten. Die Basalzellen (Pfeilspitze) zeigen sich schwach positiv. Bindegewebe (BG) und Muskelschicht (M) sind negativ.



Tabelle 31 Immunhistochemischer Nachweis der Cyclooxygenase I

Zellart/Gewebeteil		Ductuli eff.	Initial- segment	Mittel- segment	Terminal- segment
Zilienzellen	Zytoplasma	+/-			
	Zellkern	-			
	Kinozilien	-			
Hauptzellen	Zytoplasma	+/-	-	-	-
	Zellkern	-	-	-	-
	Stereozilien/ Mikrovilli	-	-	-	-
Basalzellen	Zytoplasma		++	+	+
	Zellkern		-	-	-
Apikalzellen	Zytoplasma		-	-	
	Zellkern		-	-	
Lumen/Spermien		-	-	-	-
Apikaler Epithelsaum		-	-	-	-
Basallamina		-	-	-	-
Muskelschicht		-	-	-	-
Bindegewebe		-	-	-	-
Gefäße		+++	+++	+++	+++

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

## **4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Nebenhoden**

### **4.1. Ultrastruktur der Ductuli efferentes**

Die Ductuli efferentes, welche das Rete testis des Hodens mit dem Ductus epididymidis des Nebenhodens verbinden sind mit einem unterschiedlich hohen (16 – 28  $\mu\text{m}$ ), mehrreihigen Epithel ausgestattet. Es ist deutlich niedriger als das des Nebenhodengangs und besteht aus zwei Zellarten. Die Zilienzellen, die auf ihrer luminalen Oberfläche Kinozilien tragen und die Hauptzellen mit Mikrovillibesatz (Bild 72). Das Erscheinungsbild der Hauptzellen ist unterschiedlich, wodurch sie in verschiedene Subzelltypen eingeteilt werden können. Die Typ 1-Zellen enthalten zahlreiche kleine Vesikel im apikalen Zytoplasma, die durch Einstülpung der luminalen Membran und anschließender Abschnürung zustande kommen. Dies kann ein Hinweis auf Resorptionsprozesse sein. Basal kommen große, helle Vakuolen zu liegen (Bild 74). Bei den Typ 2-Zellen sind viele elektronendichte Granula im gesamten Zytoplasma zu beobachten (Bild 73). Die Typ 3-Zellen beinhalten sowohl helle Vakuolen, als auch weiter basal gelegene dunkle Granula. Der Zellkern, der zilienlosen Hauptzellen ist unregelmäßig längsoval und beansprucht fast die gesamte Zellbreite. Er kommt zentral in der Zelle zu liegen und beinhaltet meist einen Nukleolus. Der Golgi-Apparat ist schwach entwickelt und auch das endoplasmatische Retikulum kommt nur wenig vor. Mitochondrien sind dagegen zahlreich in allen drei Zellsubtypen zu beobachten und kommen vor allem basal zu liegen (Bild 73). Kleine stark elektronendichte Glykogen-Granula sind in den Hauptzellen eingelagert (Bild 75). Der Mikrovillibesatz auf der luminalen Oberfläche ist bei allen Subtypen der Hauptzellen gleich stark ausgebildet (Bild 72, 73 und 74). Die Zilienzellen haben auch ultrastrukturell ein einheitliches Erscheinungsbild. Ihre Kinozilien ragen durchschnittlich 8  $\mu\text{m}$  ( $\pm 2,4 \mu\text{m}$ ) weit ins Lumen (Bild 72). Im Zilienquerschnitt lassen sich neun Mikrotubulipaare, die ringförmig um ein zentrales Mikrotubulipaar angeordnet sind erkennen (Bild 74). Sie halten sich also an den charakteristischen Zilienaufbau nach der „9 x 2 + 2 Regel“. Im apikalen Zytoplasma kommen zahlreiche längliche Mitochondrien zu liegen, im basalen Zytoplasma dagegen nur vereinzelt. Ebenfalls apikal zu beobachten sind vereinzelt, elektronendichte Granula (Bild 74). Der Zellkern ist

dem der Hauptzellen sehr ähnlich, längsoval bis rund und mit einem Nukleolus. Der Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum sind nur sehr undeutlich ausgeprägt. Die Epithelzellen stehen apikal über „junctional complexes“, bestehend aus „tight junctions“, „gap junctions“ und „Zonulae adhaerentes“ in Verbindung (Bild 75). Im weiter basalen Epithelbereich sind Invaginationen zwischen benachbarten Zellmembranen zu erkennen (Bild 76). Der gleichmäßig verlaufenden Basallamina schließen sich nur wenige Schichten glatter Muskelzellen und anschließend lockeres Bindegewebe an.

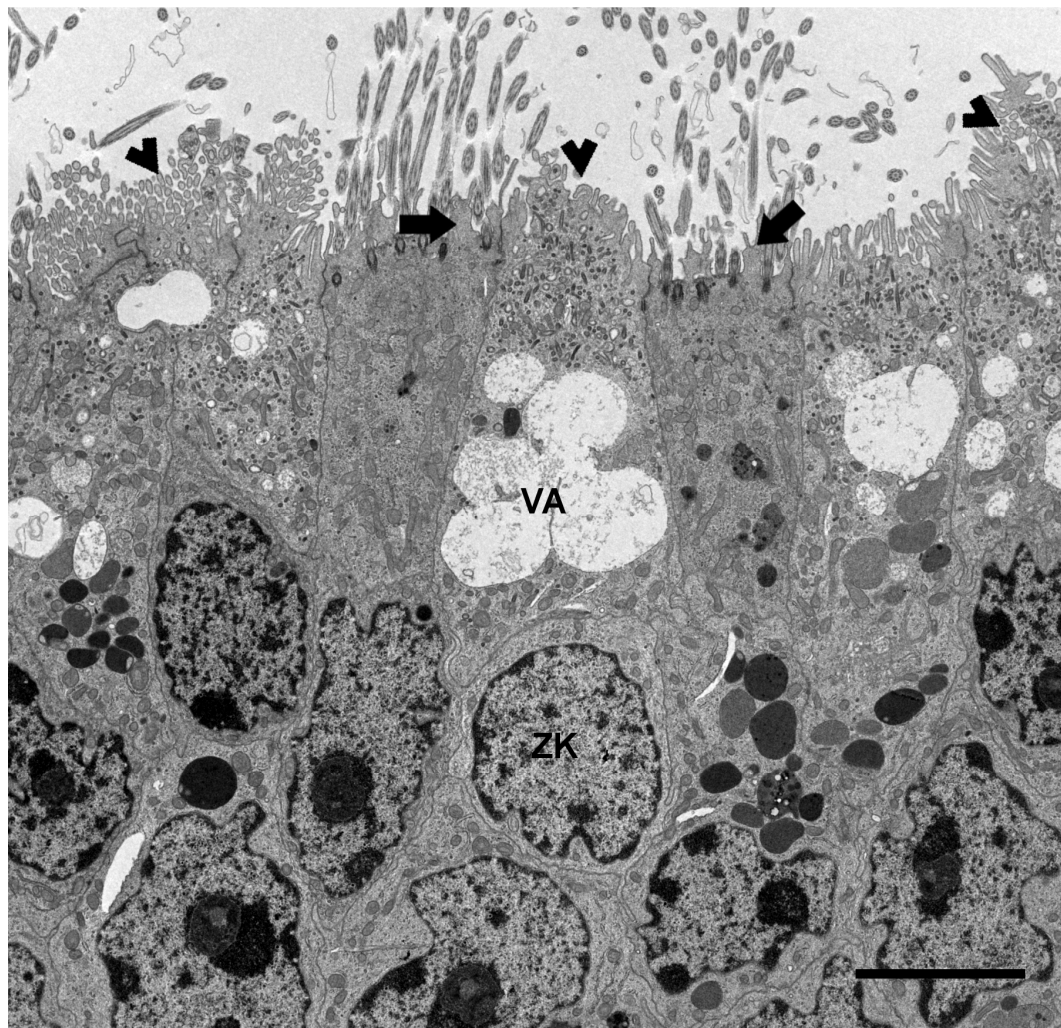


Bild 72 Überblick über das Epithel der Ductuli efferentes, SB = 5  $\mu$ m

In den Ductuli efferentes kommen zwei Zellarten vor: Die Hauptzellen, an dessen luminaler Oberfläche Mikrovilli (Pfeilspitzen) liegen und die die Zilienzellen, die Kinozilien (Pfeile) tragen. Vakuolen (VA) kommen im Zytoplasma der Hauptzellen vor.

ZK = Zellkern.

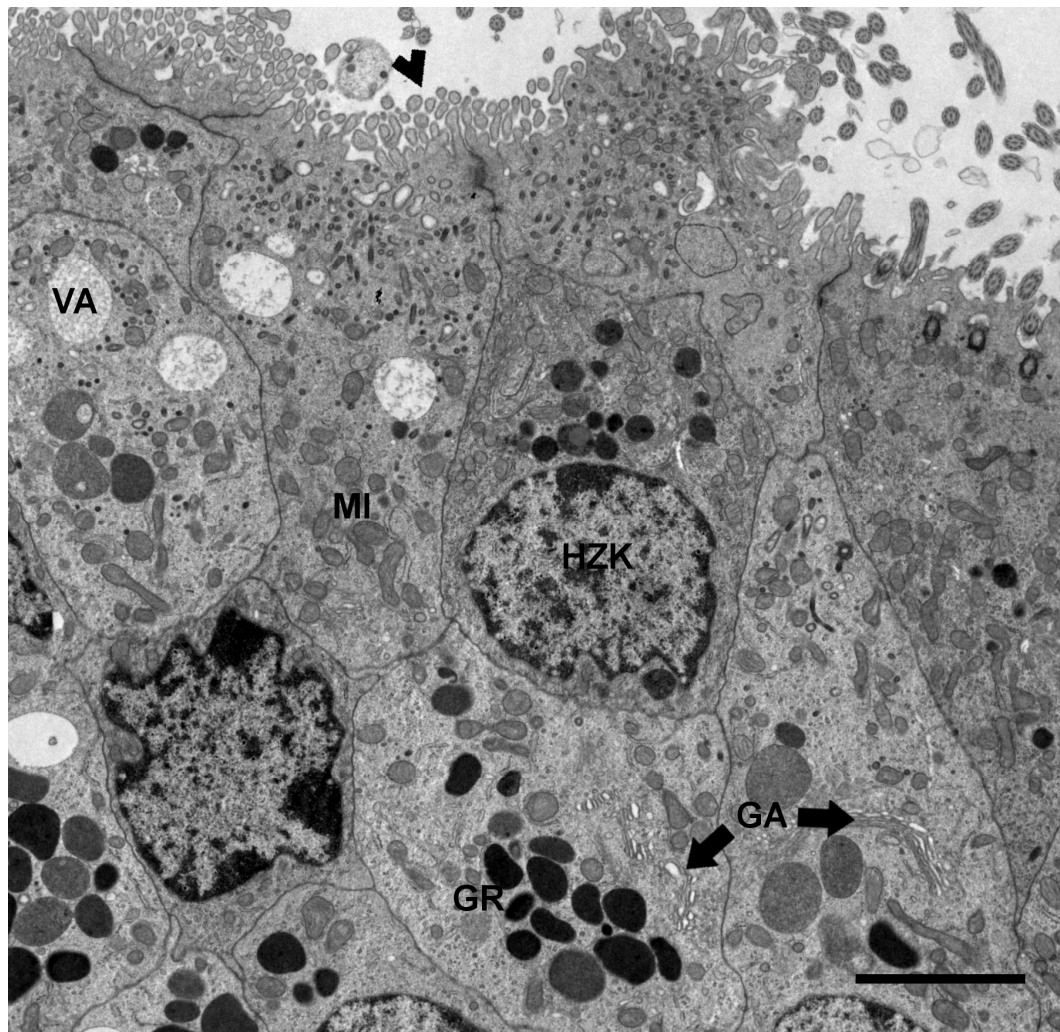


Bild 73 Hauptzellen der Ductuli efferentes, SB = 3  $\mu$ m

Die Mikrovilli (Pfeilspitze) tragenden Hauptzellen können in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Je nach Typ tragen sie nur Vesikel und Vakuolen (VA), nur Granula (GR) oder beides in ihrem Zytoplasma. Der Golgi-Apparat (GA) ist schwach ausgebildet, Mitochondrien (MI) kommen dagegen zahlreich vor. Ihr Zellkern (HZK) trägt meist einen Nukleolus.

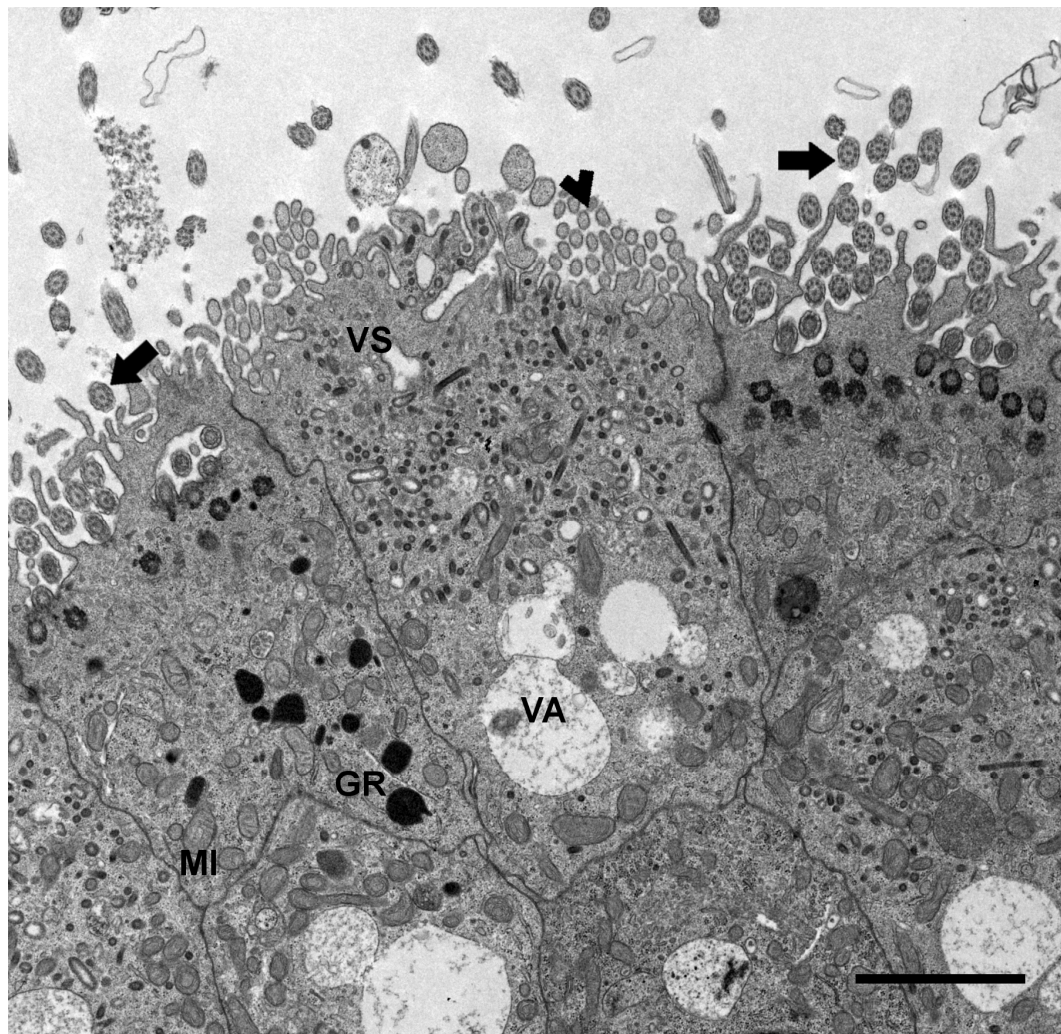


Bild 74 Haupt- und Zilienzellen der Ductuli efferentes, SB = 3  $\mu$ m

Der Typ 1 der Mikrovilli (Pfeilspitze) tragenden Hauptzellen beinhaltet im apikalen Zytoplasma Vesikel (VS) und weiter basal Vakuolen (VA). Die Kinozilien (Pfeile) der Zilienzellen zeigen im Querschnitt den „9 x 2 + 2 Aufbau“. Im Zytoplasma der Zilienzellen kommen eine Vielzahl an Mitochondrien (MI) und zum Teil elektronendichte Granula (GR) vor.

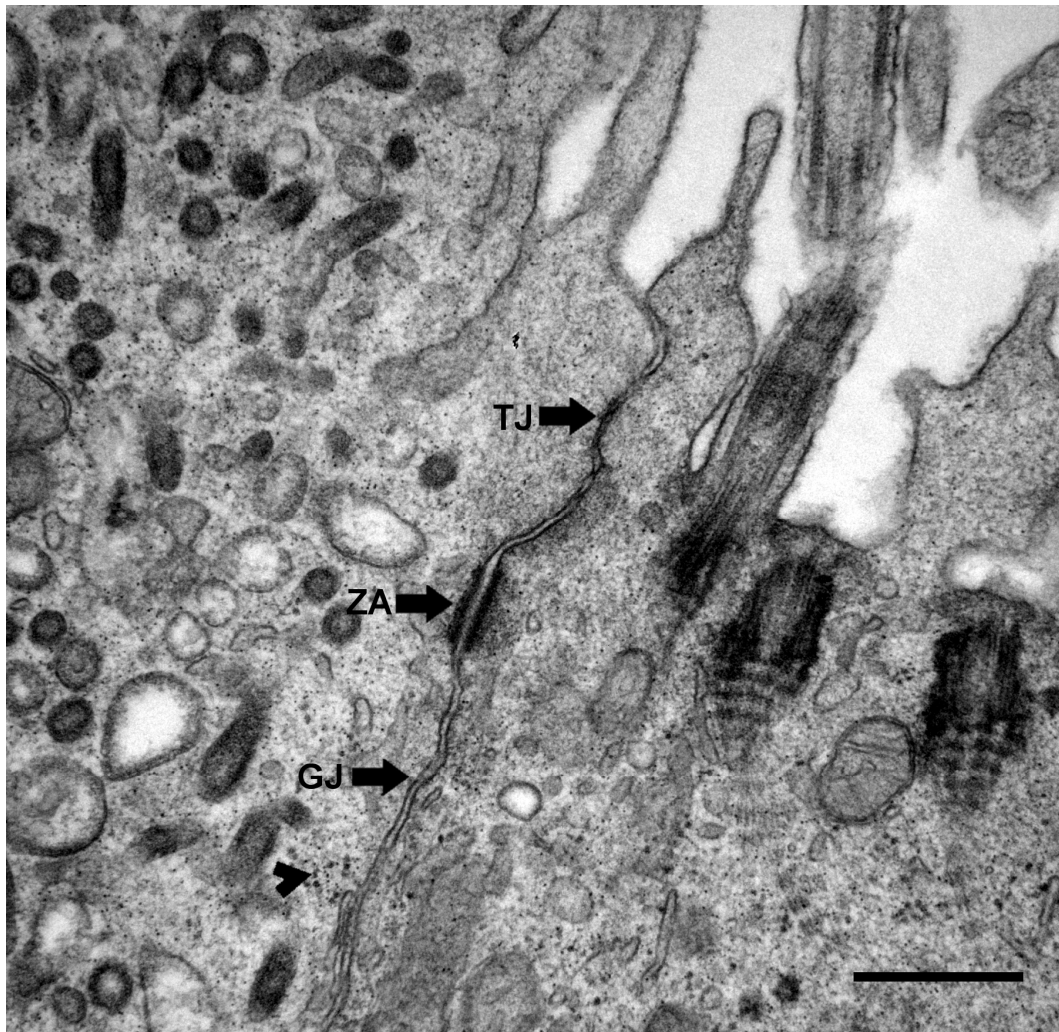


Bild 75 Zellverbindungen im apikalen Epithelbereich der Ductuli efferentes, SB = 0,5  $\mu$ m

Benachbarte Zellen stehen im apikalen Epithelbereich über „tight junctions“ (TJ), „Zonulae adhaerentes“ (ZA) und „gap junctions (GJ) in Verbindung.

Pfeilspitze = eingelagertes Glykogen.



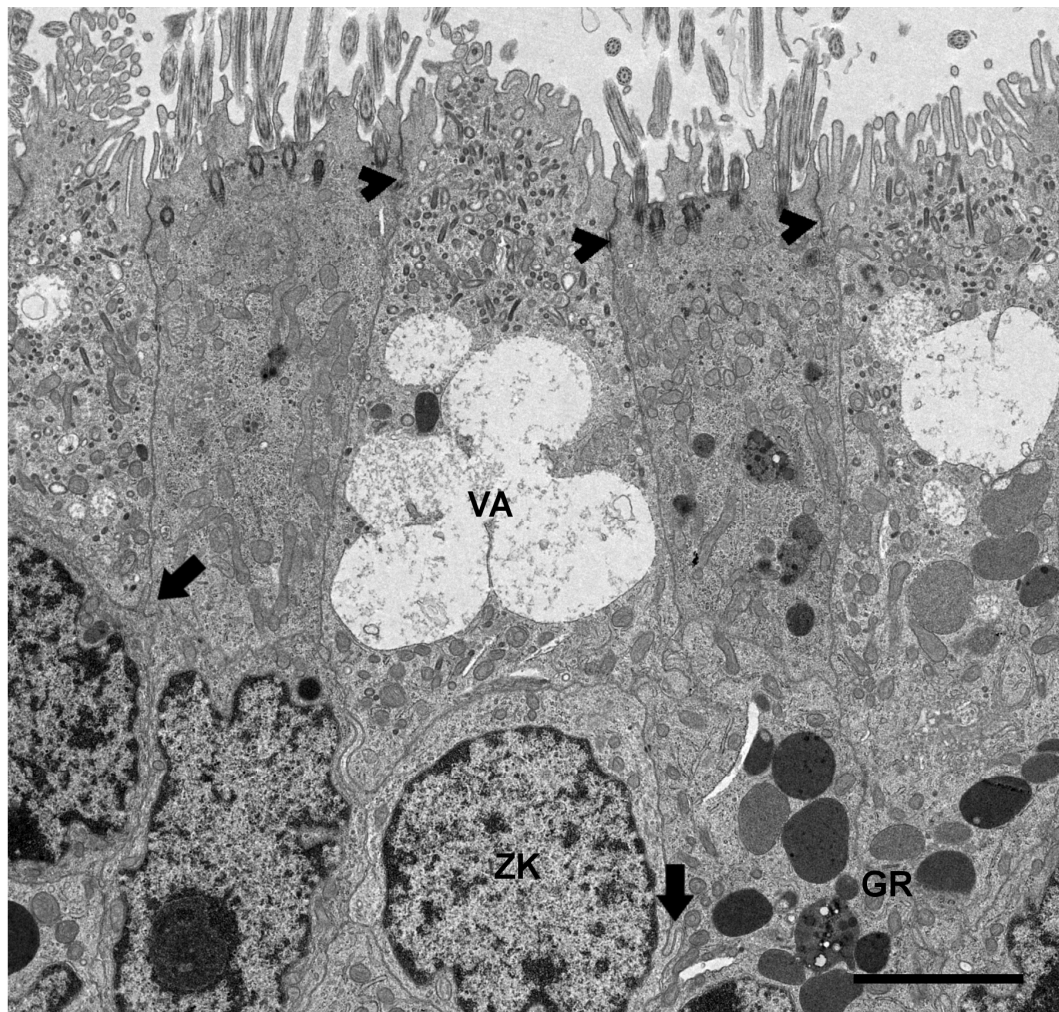


Bild 76 Zellverbindungen in den Ductuli efferentes, SB = 3  $\mu$ m

Während benachbarte Zellen apikal über „junctional complexes“ (Pfeilspitzen) in Kontakt stehen, sind sie im basalen Epithelbereich durch Invaginationen (Pfeile) verbunden.

VA = Vakuolen, GR = Granula, ZK = Zellkern.



## **4.2. Ultrastruktur des Ductus epididymidis**

### **4.2.1. Ultrastruktur des Initialsegments**

Im Initialsegment des Ductus epididymidis besteht das Epithel aus Haupt-, Basal- und Apikalzellen. An der luminalen Oberfläche tragen die hochprismatischen Hauptzellen durchschnittlich  $12,4\ \mu\text{m}$  ( $\pm 3,4\ \mu\text{m}$ ) weit ins Lumen reichende Stereozilien, die sich häufig kurz nach ihrem Ursprung verzweigen (Bild 77 und 79). Im Lumen befinden sich nur wenige Spermien und Zellen des Keimepithels. Die Sternform des Lumens kommt durch die verschieden hohen Hauptzellen zustande. Benachbarte Zellen werden im apikalen Epithelbereich über „junctional complexes“, gebildet aus „tight junctions“ und „Zonulae adhaerentes“ miteinander verbunden. Im apikalen Zytoplasma der Hauptzellen liegen eine Vielzahl von Vesikel und Vakuolen, die von kleinen Einschnürungen an der luminalen Zellmembran ausgehen (Bild 79). Oberhalb des Kerns stellt sich der ausgeprägte Golgi-Apparat deutlich dar (Bild 81). Mitochondrien kommen ebenfalls apikal vor, ihre Anzahl steigt jedoch deutlich nach basal an (Bild 78, 80 und 81). Das endoplasmatische Retikulum zieht von apikal, vorbei am Zellkern bis in das basale Zytoplasma der Hauptzellen (Bild 80 und 81). Der Zellkern der Hauptzellen ist längsoval und steht senkrecht zur Basallamina. Er beinhaltet ein bis zwei Nukleoli und das Heterochromatin liegt hauptsächlich an der Kernmembran. Der Hauptzellkern liegt in diesem Nebenhodenabschnitt in der basalen Zellhälfte (Bild 77, 78 und 80). Infranukleär sind vor allem die zahlreichen Mitochondrien auffallend (Bild 78 und 80). In diesem Bereich verbinden sich die Zellen durch Invaginationen der benachbarten Zellmembrane. So stehen auch die Basalzellen miteinander in Verbindung. Diese liegen der Basallamina breitflächig auf, sind von unregelmäßiger Form und ihre Zellausläufer schieben sich zwischen die Hauptzellen in Richtung Ganglumen. Ihr wenig Zytoplasma ist durch die zentrale Kernlage gleichmäßig um diesen verteilt. Die Mitochondrien liegen im gesamten Zytoplasma, der kleine Golgi-Apparat, das raue endoplasmatische Retikulum und die Vesikel sind dagegen meist basal des Kerns lokalisiert (Bild 78 und 82). Der Zellkern der Basalzellen ist im Verhältnis zum Zytoplasmaanteil relativ groß, rund und zum Teil mit Einkerbungen versehen. Er beinhaltet einen Nukleolus und nur wenig Heterochromatin. An der Basalmembran sind ebenfalls Lymphozyten zu erkennen. Deren kleiner runder Zellkern stellt sich durch die große Menge an

Heterochromatin dunkel dar, das Zytoplasma ist heller als das der Haupt- und Basalzellen (Bild 82). Durch diese Zellarten bildet sich ein Kernbereich in der basalen Epithelhälfte (Bild 77). Apikalzellen, deren Zellkern etwas kleiner als der der Hauptzellen ist, tragen diesen oberhalb der Kernzone. Im apikalen Zytoplasma liegen wie bei den Hauptzellen Vesikel, jedoch deutlich mehr Mitochondrien. An die dünne in Wellen, zum Teil sogar in Falten liegende Basallamina schließen sich wenige glatte Muskelzellen und Bindegewebe an (Bild 82).

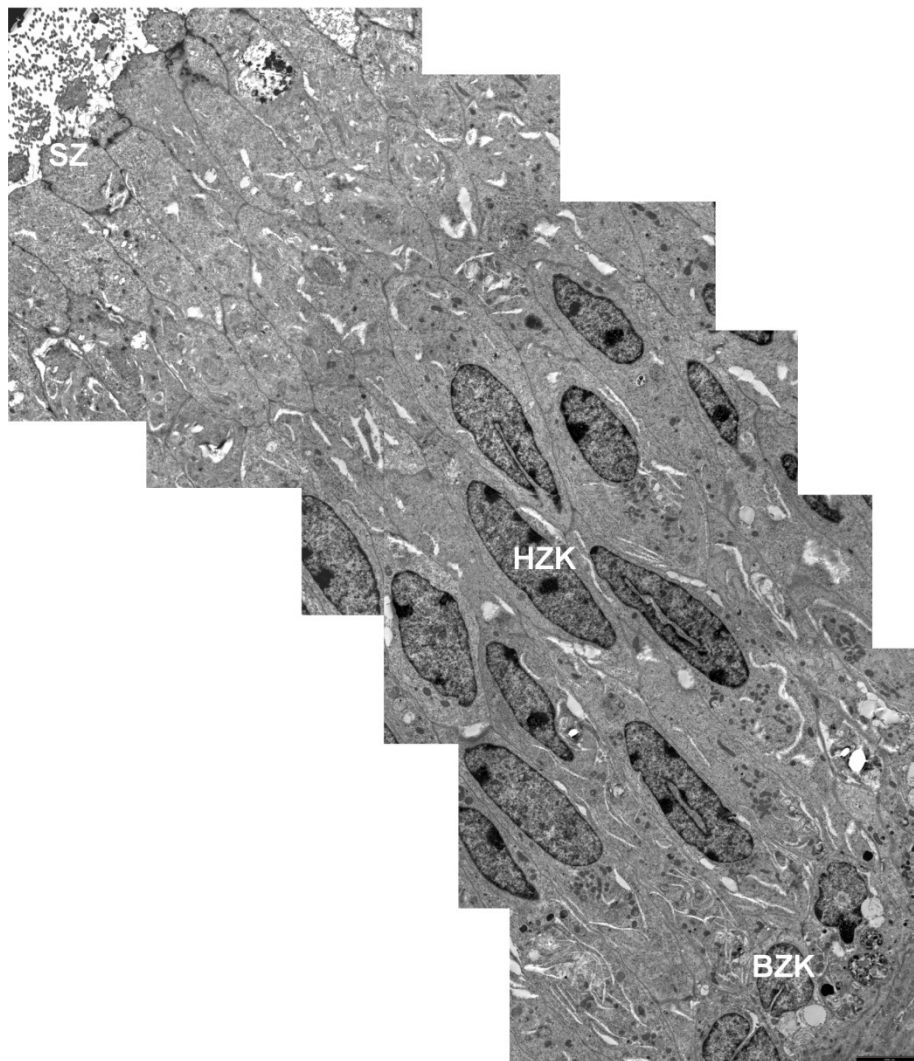


Bild 77 Übersicht über das Epithel im Initialsegment, SB = 5  $\mu$ m

Direkt auf der Basallamina kommen die Basalzellen breitflächig zu liegen. Ihr Zellkern (BZK) ist rund und liegt zentral in der Zelle. Die Hauptzellen bilden die Hauptzellart im Epithel. Ihre Zellkerne (HZK) liegen in der basalen Zellhälfte. An der luminalen Oberfläche tragen die Hauptzellen ins Lumen reichende Stereozilien (SZ).

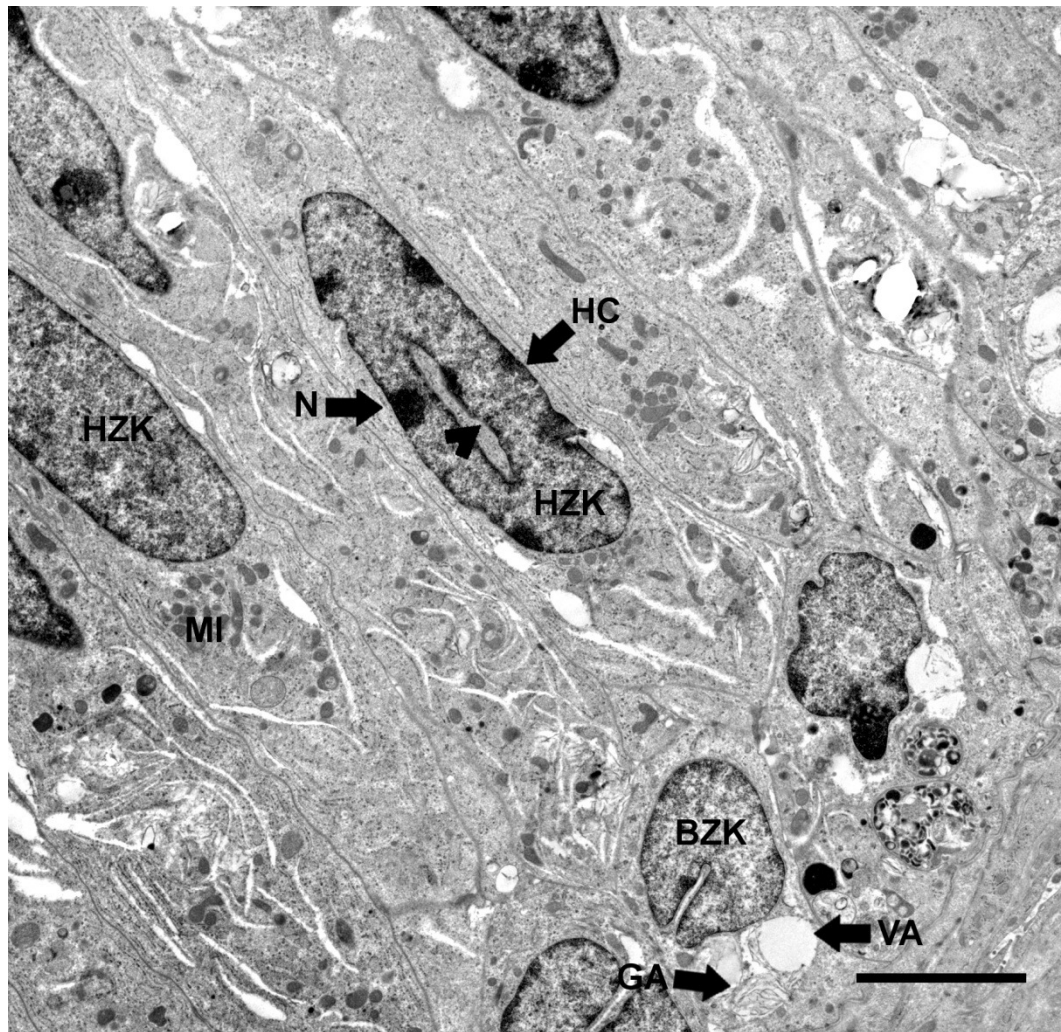


Bild 78 Basal- und Hauptzellen im Initialsegment, SB = 5  $\mu$ m

Die Zellkerne der Hauptzellen (HZK) beinhalten ein bis zwei Nukleoli (N) und wenig randständiges Heterochromatin (HC). Die Mitochondrien (MI) liegen hauptsächlich im basalen Zytoplasma. Der Golgi-Apparat (GA) und die Vakuolen (VA) liegen in den Basalzellen meist unterhalb des Basalzellkerns (BZK).

Pfeilspitze = Zytoplasma.

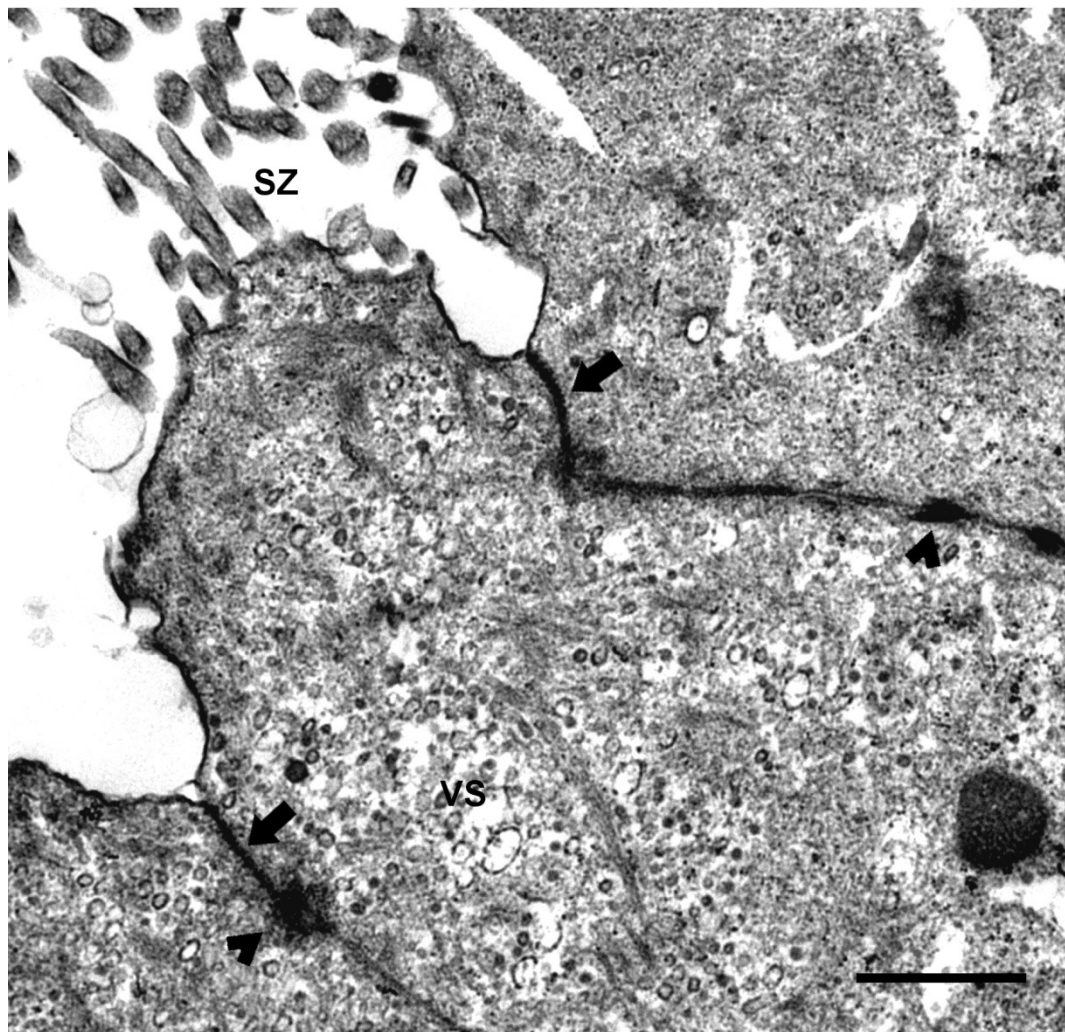


Bild 79 Apikaler Epithelbereich im Initialsegment, SB = 1  $\mu$ m

Im apikalen Bereich sind die Zellen durch „tight junctions“ (Pfeile) und Zonulae adherentes (Pfeilspitzen) verbunden. An der luminalen Oberfläche liegen Stereozilien (SZ) und im Zytoplasma Vesikel (VS).

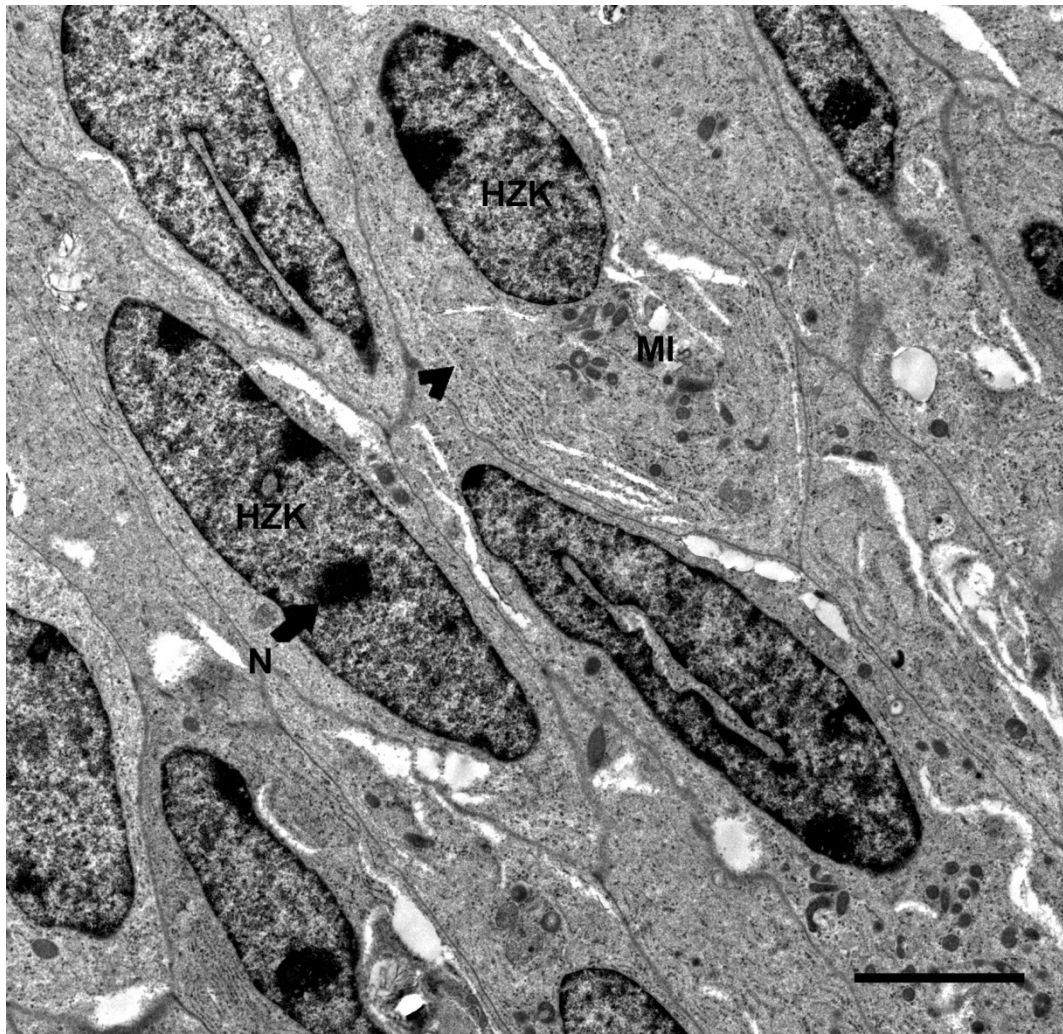


Bild 80 Hauptzellen im Initialsegment, SB = 5  $\mu$ m

Die in der basalen Zellhälfte liegenden Hauptzellkerne (HZK) beinhalten einen bis zwei Nukleoli (N). Im Zytoplasma der Hauptzellen liegt das endoplasmatische Retikulum (Pfeilspitze) und basal eine Vielzahl von Mitochondrien (MI).

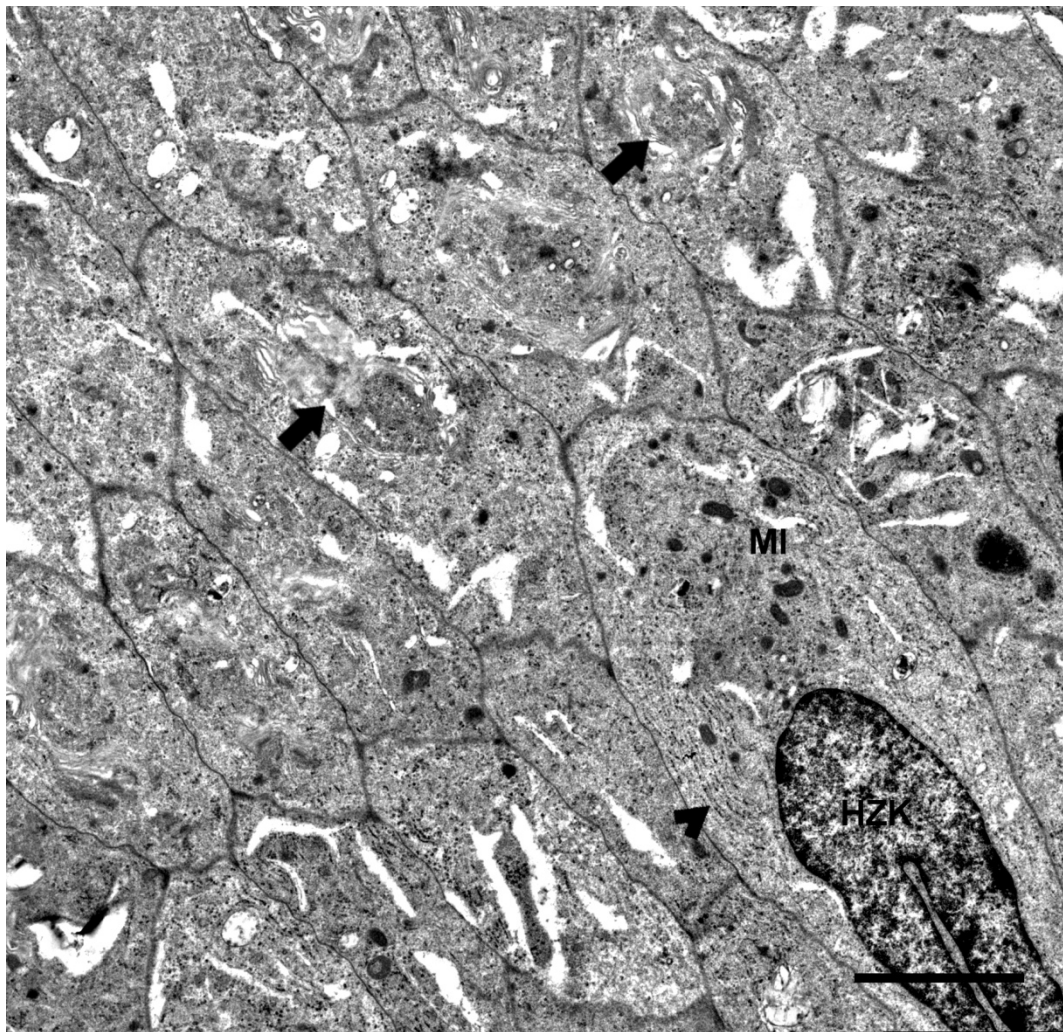


Bild 81 Zytoplasma der Hauptzellen im Initialsegment, SB = 5  $\mu$ m

Im Zytoplasma der Hauptzellen liegen der Golgi-Apparat (Pfeile), das endoplasmatische Retikulum (Pfeilspitze) und die Mitochondrien (MI).

HZK = Hauptzellkern.



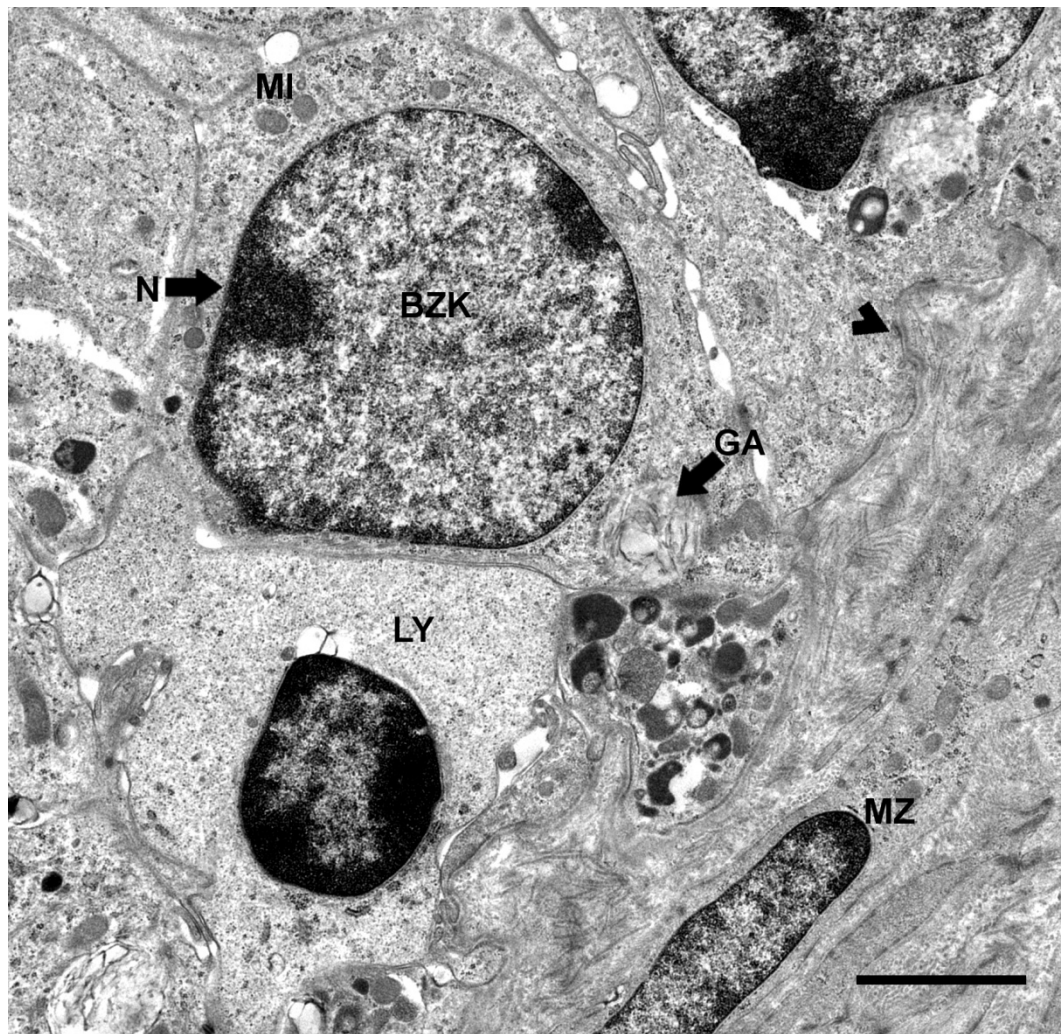


Bild 82 Basaler Epithelbereich im Initialsegment, SB = 2,5  $\mu$ m

Der Basalzellkern (BZK) mit einem dominanten Nukleolus (N) liegt zentral in der Zelle. Mitochondrien (MI) kommen im gesamten Zytoplasma vor, der Golgi-Apparat (GA) befindet sich im basalen Zytoplasmaanteil. Die Basallamina (Pfeilspitze) liegt in Wellen. Basal im Epithel finden sich auch Lymphozyten (LY). Außerhalb der Basallamina schließen sich glatte Muskelzellen (MZ) an.



#### 4.2.2. Ultrastruktur des Mittelsegments

Im Mittelsegment besteht das Epithel aus den gleichen Zelltypen wie das Epithel im Initialsegment, den Haupt-, Basal-, und Apikalzellen. Im Lumen sind zahlreiche Spermien zu finden (Bild 87). Die Hauptzellen tragen auch in diesem Abschnitt durchschnittlich  $17,1\ \mu\text{m}$  ( $\pm 2,8\ \mu\text{m}$ ) weit ins Lumen reichende Stereozilien. Das apikale Zytoplasma ist durchsetzt mit kleinen Vesikeln was auf aktive Mikropinozytose und/oder Sekretion hindeutet (Bild 86). Nach basal schließt sich eine Zone mit Vakuolen, elektronendichten Granula und einem deutlich erkennbaren Golgi-Apparat an (Bild 83 und 85). Das stark ausgeprägte endoplasmatische Retikulum zieht von dem iuxtanukleären Bereich am Kern vorbei bis in das basale Zytoplasma. Mitochondrien kommen im gesamten Zytoplasma, vor allem aber im basalen Bereich vor (Bild 85). Der zentral im Zytoplasma liegende Zellkern ist längsoval und beinhaltet meist zwei Nukleoli (Bild 83). Im apikalen Epithelbereich werden benachbarte Haupt- und Apikalzellen über „junctional complexes“ fest miteinander verbunden (Bild 86). Apikalzellen sind in diesem Abschnitt nur mehr sehr selten zu beobachten und gleichen denen des Initialsegments. Die der welligen Basallamina aufliegenden Basalzellen tragen einen deutlich kleineren runden Zellkern mit einem Nukleolus. Dieser nimmt einen Großteil des Zytoplasmas ein (Bild 84). In dem wenigen Zytoplasma ist ein kleiner Golgi-Apparat, wenig raues endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien zu finden. Bei manchen Basalzellen sind Zellausläufer, die sich zwischen die Hauptzellen in Richtung luminaler Oberfläche schieben, wie im Initialsegment zu beobachten. Benachbarte Zellen stehen im basalen Epithelbereich über Invaginationen in Verbindung. Der dünnen, in Wellen liegenden Basallamina schließen sich nach außen mehrere Schichten an glatten Muskelzellen an (Bild 84). Lymphozyten sind wie im Initialsegment hauptsächlich an der Basallamina liegend zu beobachten. Mastzellen kommen im lockeren Bindegewebe, welches sich der Muskelzellschicht anschließt und reich an kollagenen Fasern ist vor (Bild 88).

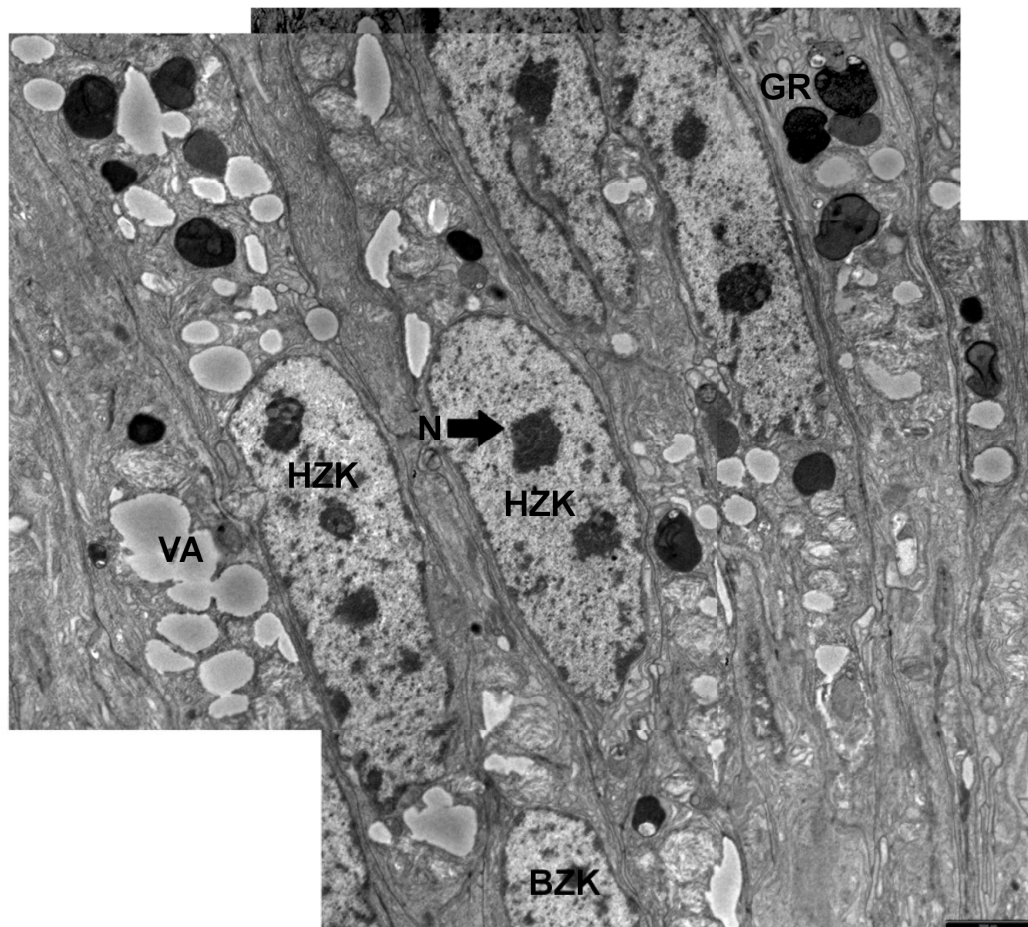


Bild 83 Hauptzellen im Mittelsegment, SB = 2,5  $\mu$ m

Die längsovalen Hauptzellkerne (HZK) tragen meist zwei Nukleoli (N). Im iuxtanukleären Zytoplasma sind sowohl Vakuolen (VA) als auch elektronendichte Granula (GR) zu beobachten. Die Zellkern der Basalzellen (BZK) liegt deutlich weiter basal als der der Hauptzellen.

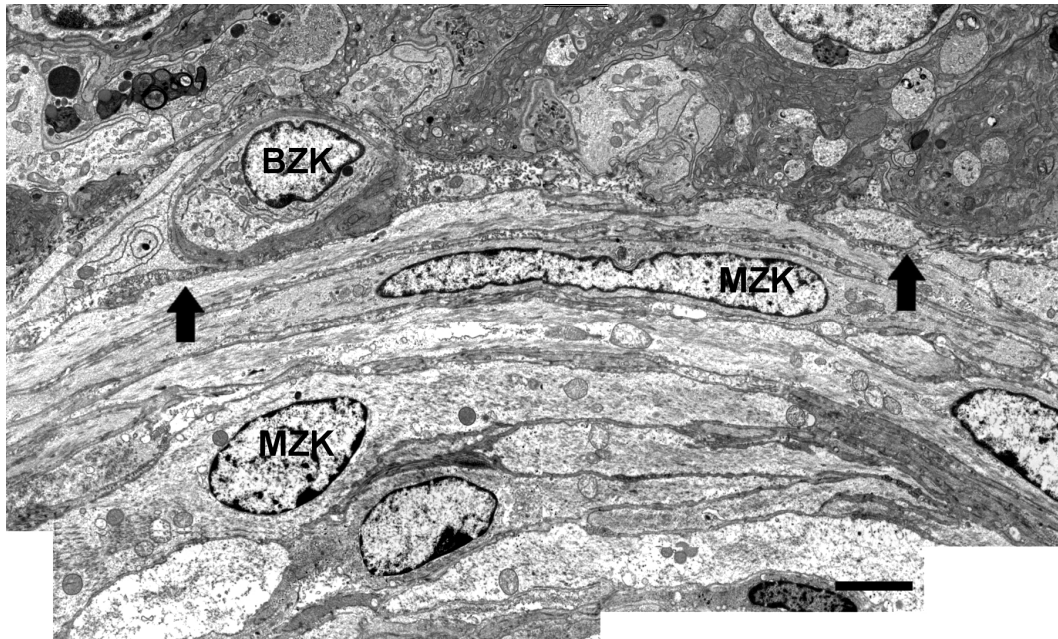


Bild 84 Basaler Epithelbereich im Mittelsegment, SB = 3  $\mu$ m

Den Basalzellen mit ihren runden Zellkernen (BZK) schließt sich eine dünne in Wellen liegende Basallamina (Pfeile) und glatte Muskelzellen an.

MZK = Muskelzellkern.

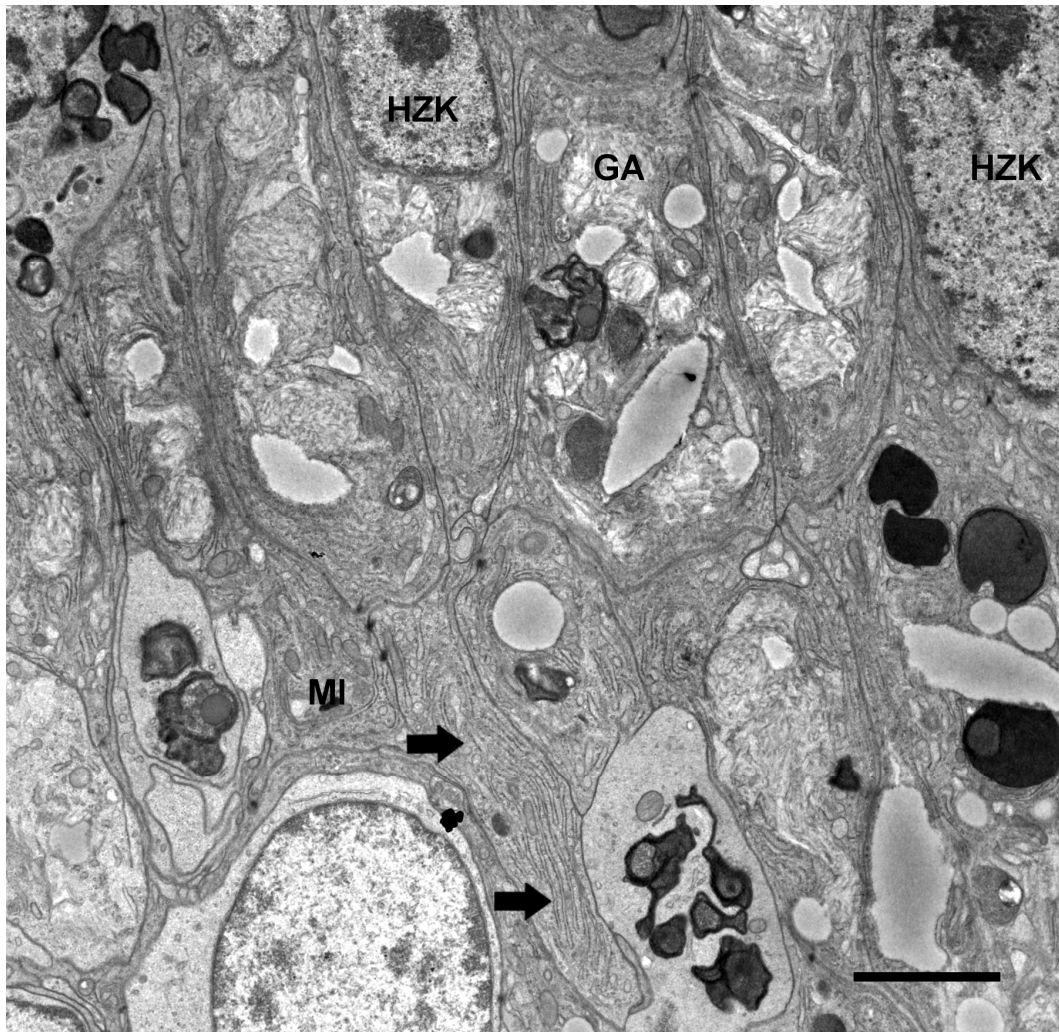


Bild 85 Zellorganellen der Hauptzellen im Mittelsegment, SB = 2,5  $\mu$ m

Der Golgi-Apparat (GA) liegt apikal des Hauptzellkerns (HZK). Das gut ausgebildete endoplasmatische Retikulum (Pfeile) liegt sowohl iuxtanukleär, zieht aber auch am Zellkern vorbei nach basal. Mitochondrien (MI) kommen hauptsächlich im basalen Zytoplasma vor.

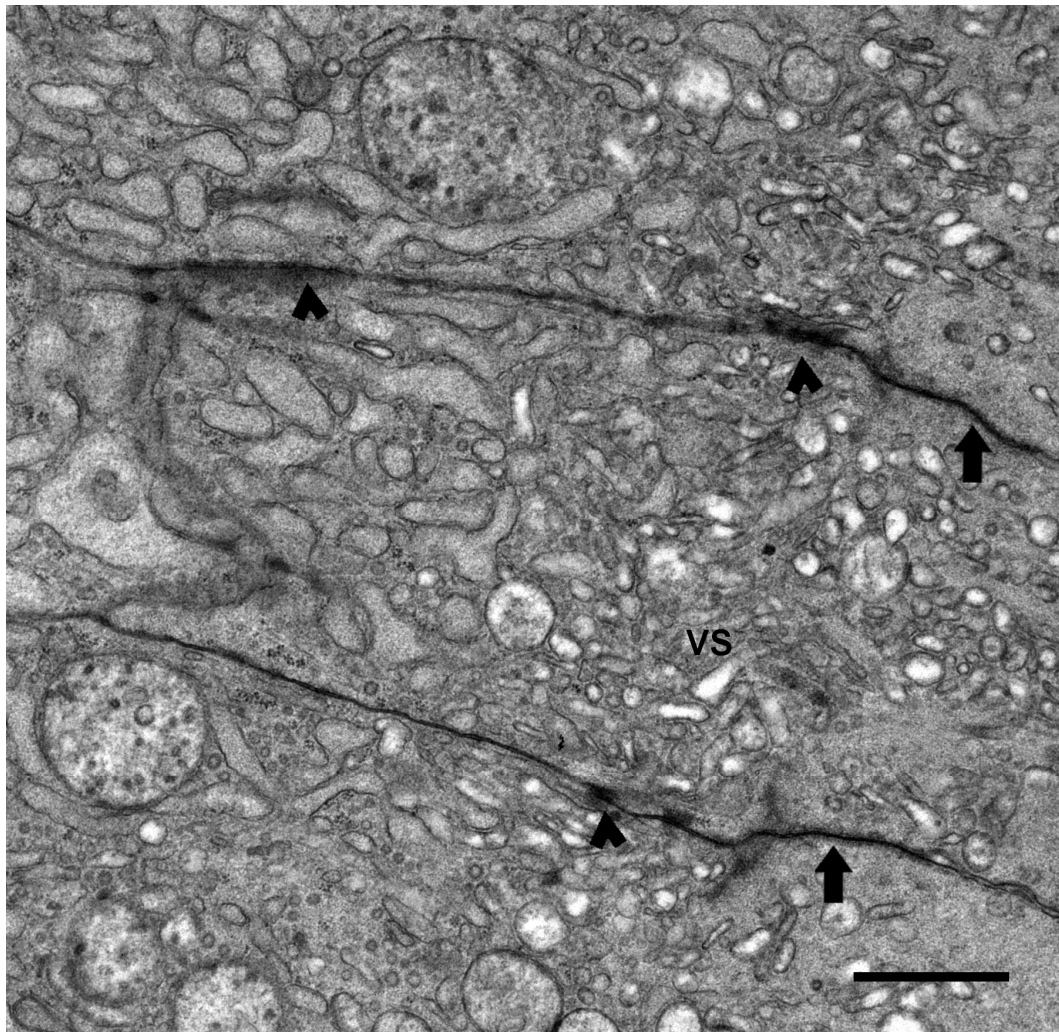


Bild 86 Apikales Zytoplasma im Mittelsegment, SB = 1  $\mu$ m

Im apikalen Zytoplasma liegen zahlreiche Vesikel (VS). Benachbarte Zellmembrane stehen sowohl über „tight junctions“ (Pfeile) als auch über Zonulae adherentes (Pfeilspitzen) in Verbindung.



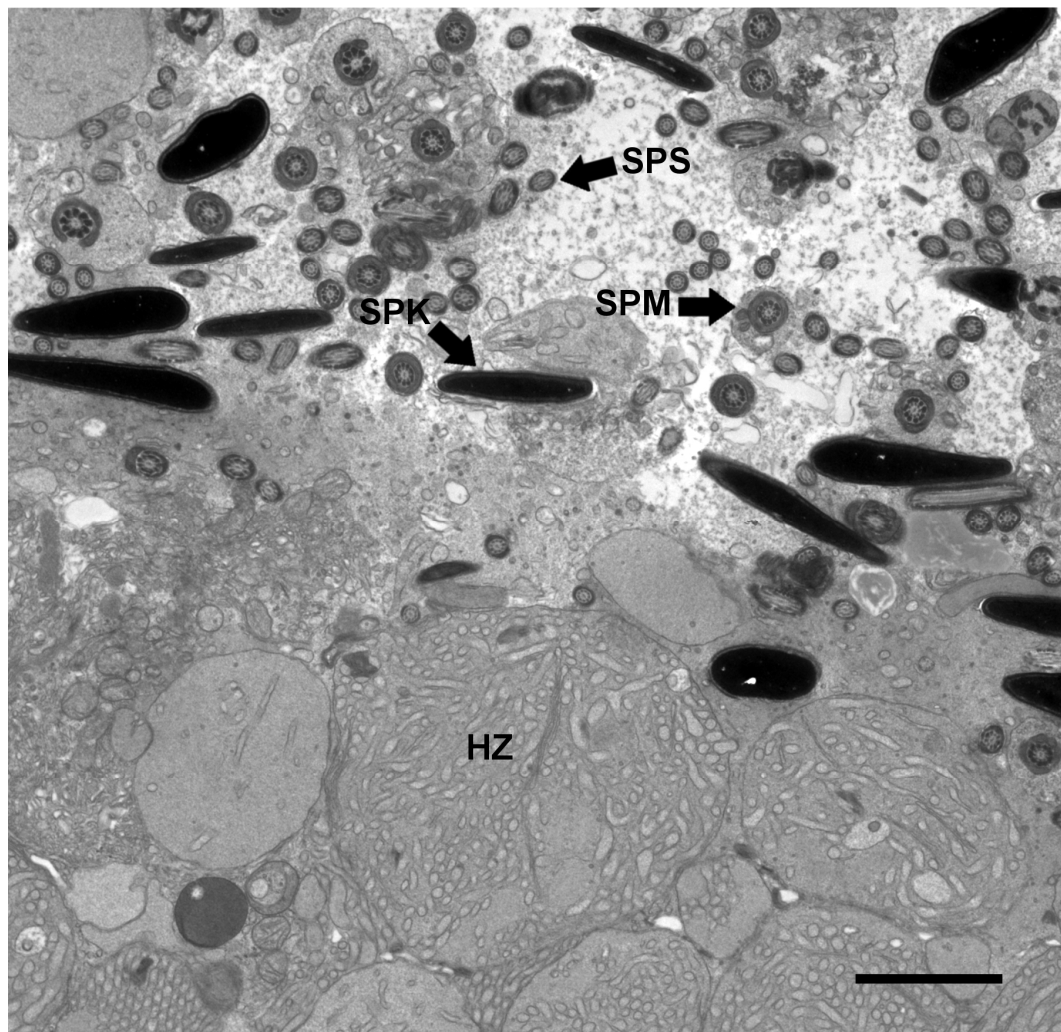


Bild 87 Spermien im Mittelsegment, SB = 2,5  $\mu$ m

Im Lumen des Ductus epididymidis sind im Mittelsegment zahlreiche Spermien, bestehend aus Spermienkopf (SPK), Spermienmittelstück (SPM) und Spermischwanz (SPS) zu beobachten.

HZ = Hauptzelle.

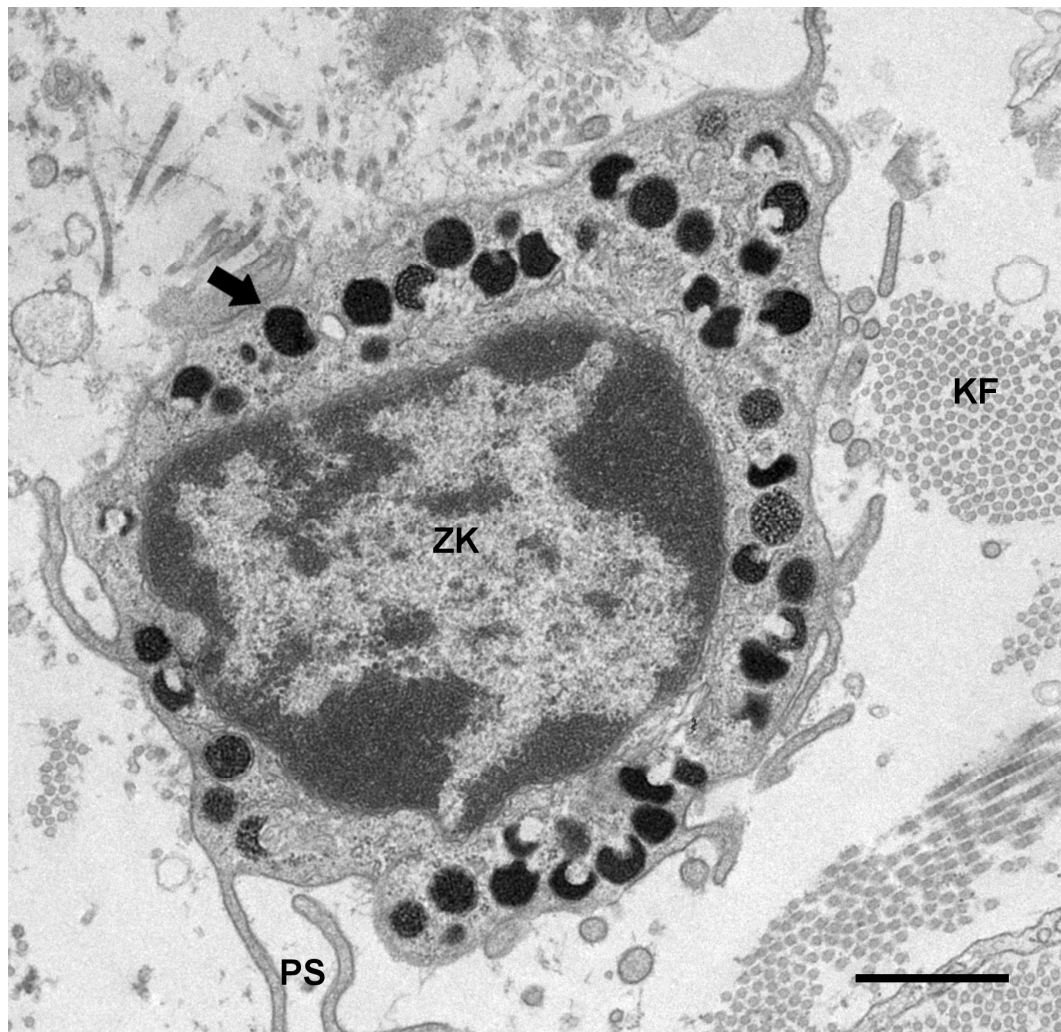


Bild 88 Mastzelle im Mittelsegment, SB = 1  $\mu$ m

Neben dem Zellkern (ZK) und den Zellorganellen liegen im Zytoplasma von Mastzellen noch zahlreiche elektronendichte Vesikel (Pfeil). Diese und die Pseudopodien (PS) geben der Mastzelle ihr typisches Aussehen. Sie liegt im lockeren Bindegewebe indem zusätzlich Kollagenfasern (KF) aufzufinden sind.

#### 4.2.3. Ultrastruktur des Terminalsegments

Im Terminalsegment kommen keine Apikalzellen mehr vor. Die Hauptzellen sind zahlreicher als die Basalzellen (3 : 1) vorhanden. Die Stereozilien an der luminalen Oberfläche der Hauptzellen sind mit einer durchschnittlichen Länge von 7,3  $\mu\text{m}$  ( $\pm 2,3 \mu\text{m}$ ) kürzer als in den anderen Nebenhodenabschnitten (Bild 89). Apikal sind die hochprismatischen Hauptzellen über „junctional complexes“ fest verbunden. In der zytoplasmatischen Apikalzone liegen wie in den vorhergehenden Abschnitten Vesikel und Vakuolen, die auf mikropinozytotische Vorgänge und Sekretionsprozesse hinweisen (Bild 91). Der Zellkern der Hauptzellen ist längsoval, liegt in der basalen Epithelhälfte und beinhaltet einen oder zwei Nukleoli. Das Heterochromatin ist im gesamten Kern verteilt (Bild 89, 92 und 93). Der deutlich ausgeprägte Golgi-Apparat liegt oberhalb des Zellkerns. Er umschließt kleine Vesikel und ist kompakter als in den anderen Segmenten (Bild 89, 90 und 92). Die Mitochondrien liegen hauptsächlich im basalen Zytoplasma der Hauptzellen (Bild 93). Das endoplasmatische Retikulum ist dicht mit Ribosomen besetzt und meist oberhalb des Golgi-Apparates lokalisiert, aber auch weiter basal aufzufinden (Bild 90 und 92). Die Basalzellen des Terminalsegments sind in deutlich geringerer Anzahl als in den vorhergehenden Abschnitten vorhanden und liegen der Basallamina breitflächig auf. Ihr wenig Zytoplasma liegt ringförmig um den ovalen Zellkern und enthält nur sehr wenig Zellorganellen, Lysosomen sind dagegen häufiger zu beobachten. Der Zellkern beinhaltet einen Nukleolus (Bild 93). Es sind Ausziehungen der Basalzellen nach apikal zu erkennen, diese erreichen jedoch nicht die luminale Oberfläche. Im Basalbereich sind die Zellmembranen der benachbarten Zellen durch Invaginationen miteinander verbunden. Intraepitheliale Lymphozyten kommen vereinzelt nahe der Basallamina vor. Diese liegt im Terminalsegment leicht gewellt direkt im Anschluss an die Basalzellen (Bild 93). Es folgt eine Bindegewebs- und anschließende glatte Muskelschicht. Im Laufe des Ductus epididymidis hat das Epithel deutlich an Höhe verloren, sodass es im Terminalsegment die geringste Höhe aufweist. Im Lumen liegen in diesem Nebenhodenbereich massenhaft Spermien.



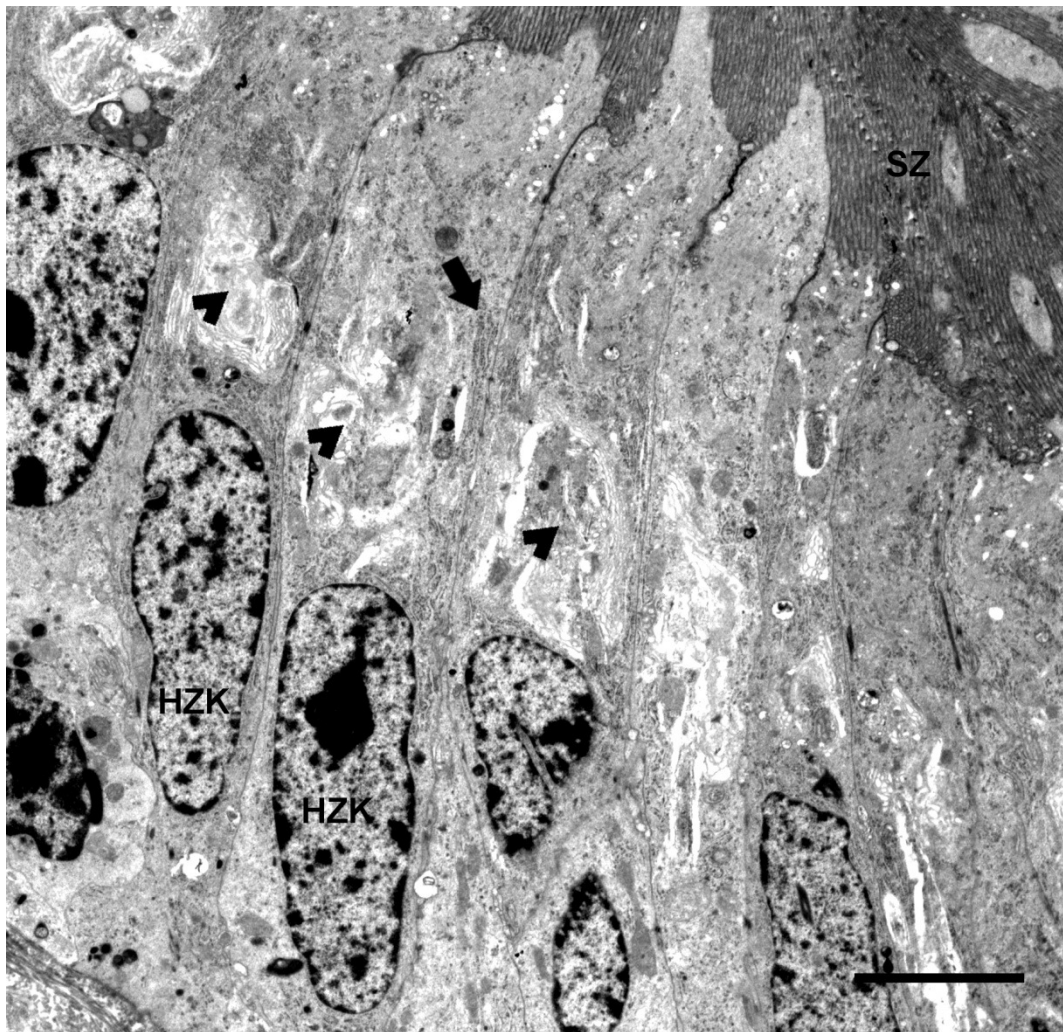


Bild 89 Apikaler Bereich des Terminalsegments, SB = 5  $\mu$ m

Die Hauptzellkerne (HZK) liegen in der basalen Zellhälfte, oberhalb liegt der Golgi-Apparat (Pfeilspitzen) und darüber das endoplasmatische Retikulum (Pfeil). Die Stereozilien (SZ) sind kürzer als in den vorhergehenden Abschnitten.



Bild 90 Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum, SB = 1  $\mu\text{m}$

Der Golgi-Apparat (GA) und das raue endoplasmatische Retikulum (Pfeilspitze) liegen oberhalb des Hauptzellkerns (HZK).

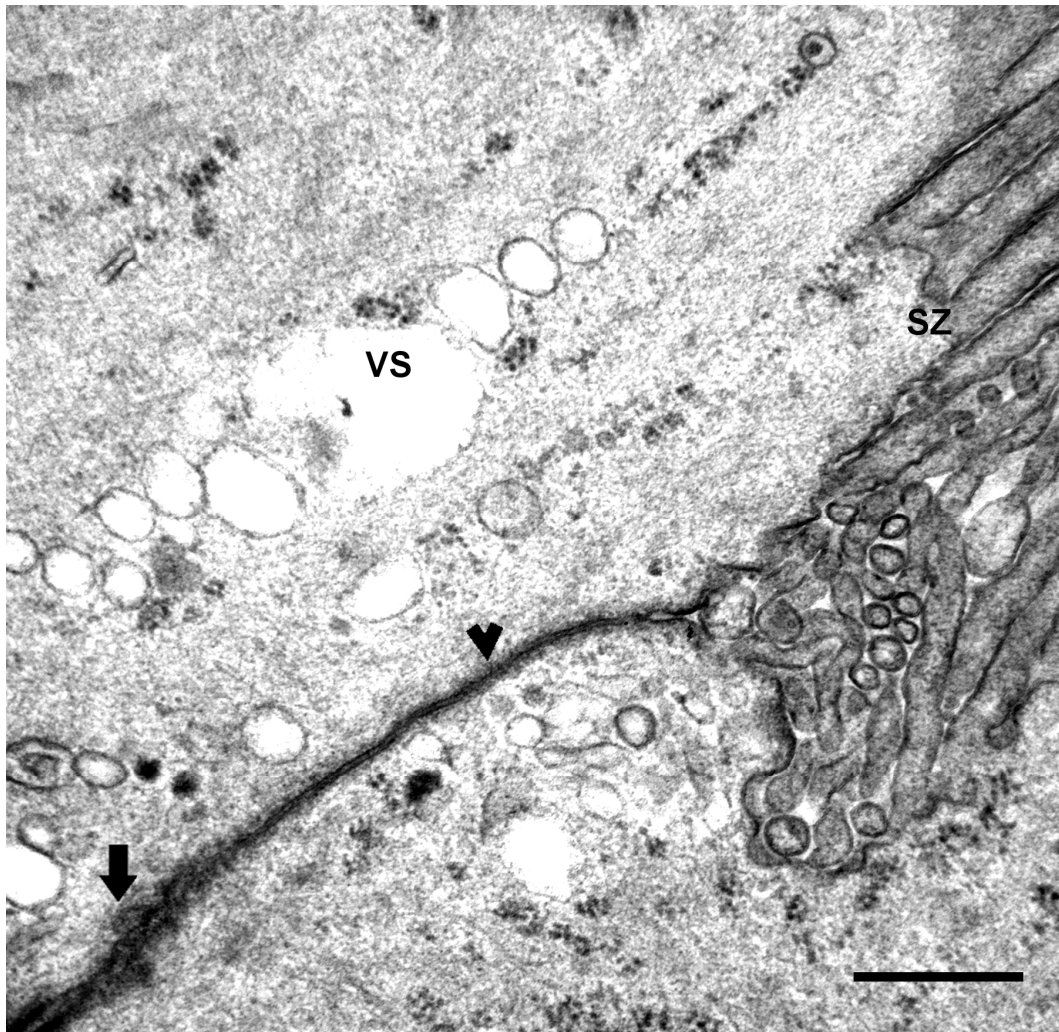


Bild 91 Zellverbindungen im apikalen Epithelbereich, SB = 0,5  $\mu$ m

Die Verbindung zweier Zellen erfolgt über „junctional complexes“, bestehend aus „tight junctions“ (Pfeilspitze) und Zonulae adhaerentes (Pfeil).

SZ = Stereozilien, VS = Vesikel.

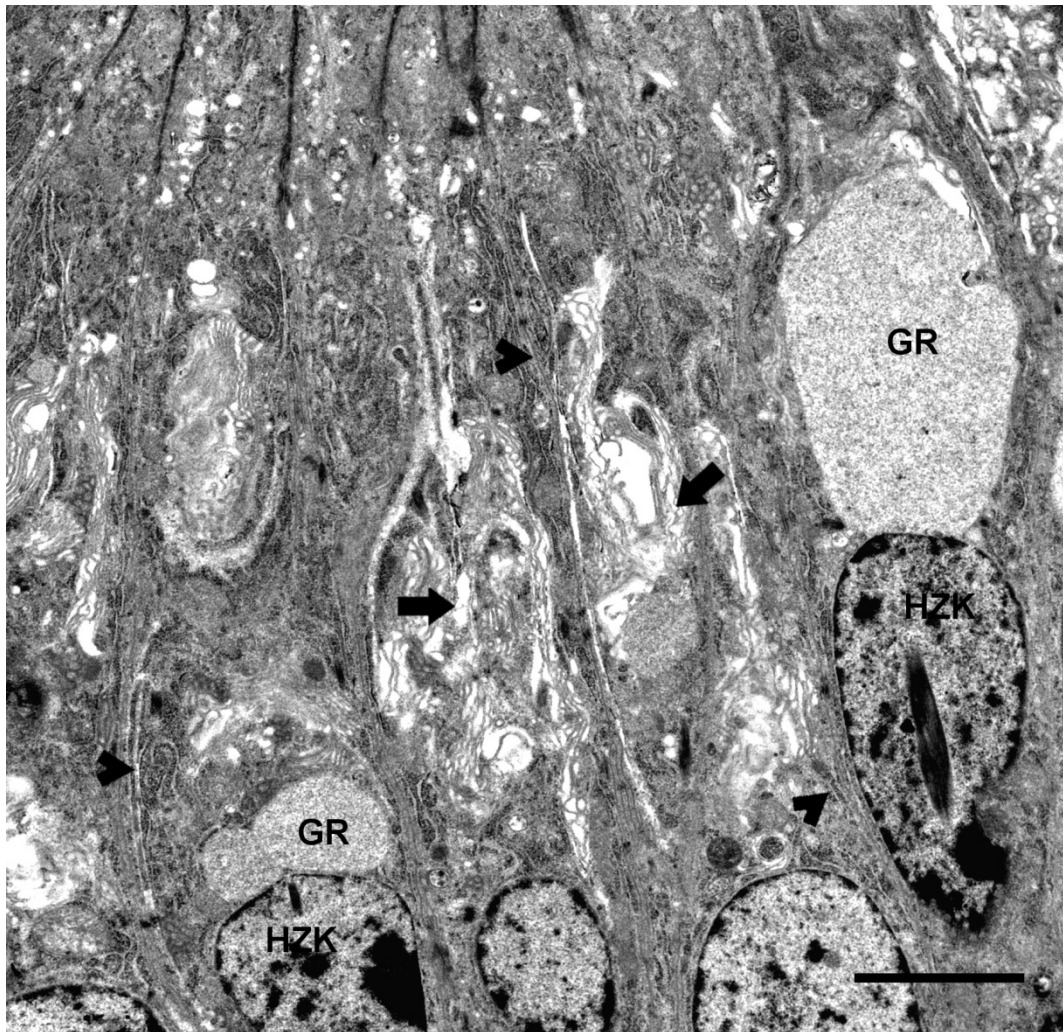


Bild 92 Apikales Zytoplasma der Hauptzellen, SB = 2,5  $\mu$ m

Im Zytoplasma oberhalb der Hauptzellkerne (HZK) sind der Golgi-Apparat (Pfeile) und das raue endoplasmatische Retikulum (Pfeilspitzen) deutlich zu erkennen. Granula (GR) kommen ebenfalls vor.

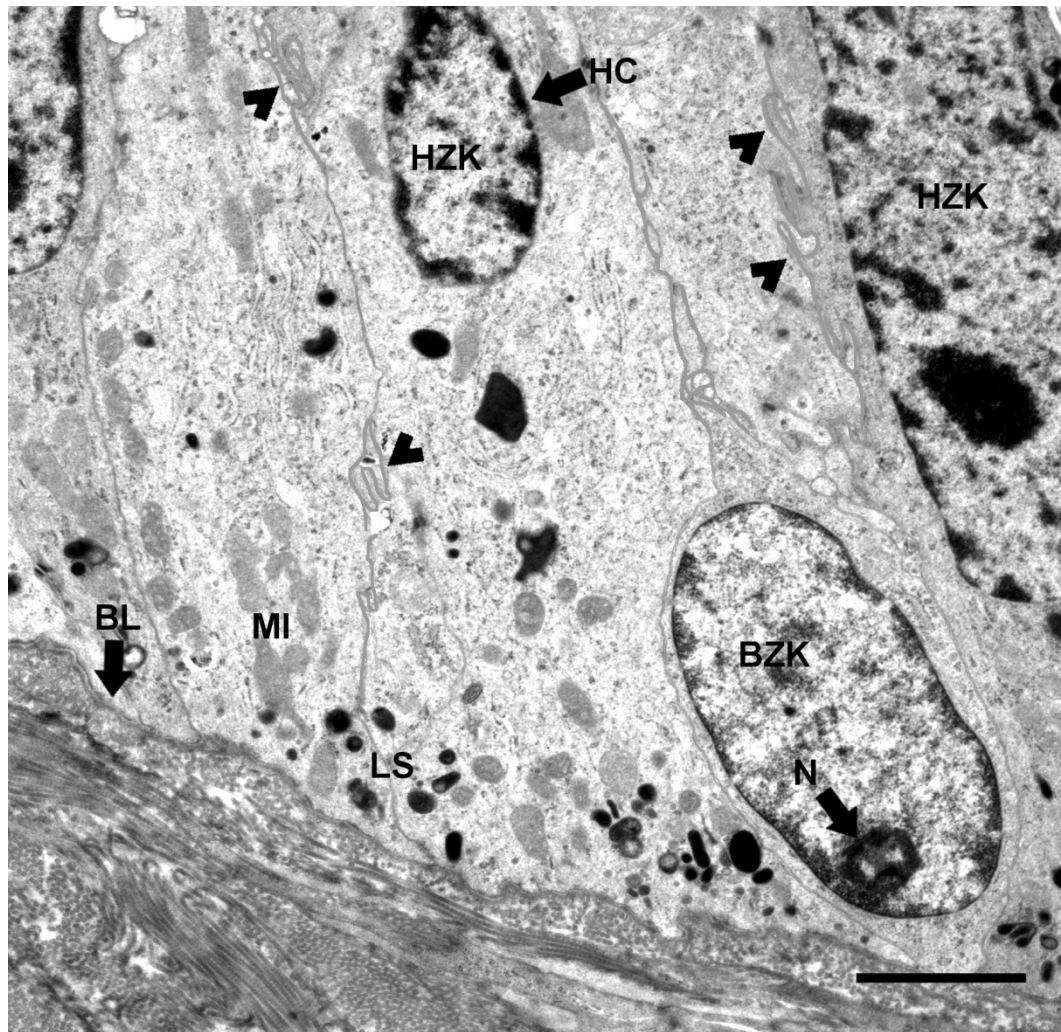


Bild 93 Terminalsegment, basaler Epithelbereich, SB = 2,5  $\mu$ m

Deutlich erkennbare Invaginationen (Pfeilspitzen) zur Zellverbindung. Im basalen Zytoplasma der Hauptzellen liegen Mitochondrien (MI) und Lysosomen (LS). Die Basallamina (BL) liegt in leichten Wellen.

HZK = Hauptzellkern, HC = Heterochromatin, BZK = Basalzellkern, N = Nukleolus.



## V. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem histologischen und ultrastrukturellen Aufbau sowie der Glyko- und Immunhistochemie des Nebenhodens des Pferdes. Makroskopisch liegt der Nebenhoden dem horizontal liegenden Hoden dorsal in Längsrichtung auf und ist mit diesem durch Gekröse und das Lig. testis proprium fest verbunden. Er lässt sich makroskopisch in Caput, Corpus und Cauda epididymidis unterteilen. Diese Einteilung ist bezüglich histologischen Aspekten wie der Epithelhöhe, den Epithelzelltypen, dem Oberflächenbesatz der Epithelzellen und dem Lumendurchmesser nicht ausreichend. Das Caput epididymidis beherbergt unter mikroskopischer Betrachtung nicht nur Teile des Ductus epididymidis, sondern auch die Ductuli efferentes. Somit ist eine genauere Segmenteinteilung aufgrund histologischer, ultrastruktureller und histochemischer Gesichtspunkte nötig. Der Ductus epididymidis wird in der Literatur für verschiedene Tierarten in eine unterschiedliche Anzahl von Segmenten unterteilt. Jedoch ist die Segmentierung des Nebenhodens innerhalb einer Tierart nicht immer konsistent. Obwohl Nicander (1958) für den Nebenhoden des Hengstes, wie für den von Bullen und Schafbock eine Einteilung in sechs Abschnitte vorgeschlagen hat, wird er in den meisten neueren Arbeiten in Ductuli efferentes und drei folgende Abschnitte des Ductus epididymidis unterteilt (AMANN et al., 1979; LOPEZ et al., 1989; PARILLO et al., 1997, 1998; RETAMAL et al., 2000; LOPEZ et al., 2007; SOSTARIC et al., 2008). Fouchecourt (2000) teilt ihn dagegen in zehn Abschnitte um die Proteinpräsenz und Sekretion genauer zu beschreiben. In meiner Arbeit wird der Nebenhoden ebenfalls in die Ductuli efferentes und die anschließenden drei Nebenhodenabschnitte, Initial-, Mittel-, und Terminalsegment unterteilt. Dabei entsprechen Ductuli efferentes und Initialsegment dem Caput, Mittelsegment dem Corpus und Terminalsegment der Cauda epididymidis.

### 1. Ductuli efferentes

Am kranialen Pol entlässt der Hoden, die Tunica albuginea testis durchbrechende Ductuli efferentes. Diese beim Pferd 14 - 17 Kanälchen verbinden das Rete testis des Hodens mit dem Anfangsabschnitt des Ductus epididymidis (HEMEIDA et al., 1978). Dabei bilden die parallel zueinander verlaufenden Kanälchen mehrere

Eintrittsporten zum Ductus epididymidis (ILIO & HESS, 1994). Das unterschiedlich hohe Epithel (16 - 28  $\mu\text{m}$ ) ist mehrreihig und hochprismatisch und besteht aus zwei Zellarten: den Hauptzellen und den Zilienzellen. Die Hauptzellen, dessen Zytoplasma heller erscheint, tragen einen Mikrovillibesatz auf ihrer luminalen Oberfläche. Die dunkleren Zilienzellen tragen Kinozilien, die in das in diesem Abschnitt runde Ganglumen reichen. Auch Kuhrau (1994) beschreibt diese zwei Zelltypen in den Ductuli efferentes des Hengstes. Elektronenmikroskopisch lassen sich im Epithel der Ductuli efferentes Kinozilien-tragende Zellen von Hauptzellen mit Mikrovillibesatz unterscheiden. In früheren Untersuchungen am Nebenhoden des Pferdes (ARRIGHI et al., 1994) und des Esels (AURELI et al., 1984) werden ebenfalls diese zwei Zelltypen im Epithel der Ductuli efferentes beobachtet, wobei Arrighi et al. (1994) noch zusätzlich Lipofuscin-reiche Zellen sowie Makrophagen und Lymphozyten beschreiben. Lopez et al. (1989) berichten von Basalzellen in den Ductuli efferentes des Pferdes. Diese konnte ich in meinen Untersuchungen nicht vorfinden. Auch Alkafafy (2005) und Schick (2006) konnten keine Basalzellen in den Ductuli efferentes von Rind und Hund nachweisen.

Bei den Zilienzellen konnte ich durchschnittlich 8  $\mu\text{m}$  ( $\pm 2,4 \mu\text{m}$ ) weit ins Lumen reichende Kinozilien beobachten. Diese lassen im Querschnitt die charakteristische  $9 \times 2 + 2$  Anordnung ihrer Mikrotubuli erkennen. Die Aufgabe des Weitertransports der Spermien im Lumen ist schon durch den Aufbau der Kinozilien festgelegt. Die neun ringförmig angeordneten Mikrotubulipaare bestehen immer aus einem vollständig entwickelten Mikrotubulus A und einem unvollständigen Mikrotubulus B, die fest miteinander verschmolzen sind. Der vollständige Mikrotubulus A besitzt zwei Dyneinarme, welche sich mit den B-Mikrotubuli der benachbarten Mikrotubulipaare verbinden und so ein Gleitvorgang stattfinden kann. Durch die feste Verankerung der Kinozilien wird aus dieser Gleitbewegung eine Verbiegung (HARTMANN, 2009). Die Spermien werden somit aktiv weitertransportiert. Im apikalen Zytoplasma der Zilienzellen kommen zahlreiche längliche Mitochondrien vor. Dies beschreibt sowohl Kuhrau (1994) bei ihren Untersuchungen an den Ductuli efferentes des Pferdes, als auch Schick (2006) bei den Ductuli efferentes des Hundes. Auch die schwache Ausprägung des Golgi-Apparats und des endoplasmatischen Retikulums in den Zilienzellen schildern Schick (2006) und Kuhrau (1994) entsprechend zu meinen

Ergebnissen. Der längsovale bis runde Zellkern der Zilienzellen mit einem Nukleolus ist dem der Hauptzellen sehr ähnlich liegt aber im Vergleich zu diesen weiter basal.

In elektronenmikroskopischer Darstellung können die Hauptzellen, in drei Subtypen unterteilt werden. Sie tragen auf ihrer luminalen Oberfläche einen Mikrovillisaum, der diese deutlich vergrößert. Die drei Subtypen unterscheiden sich durch unterschiedliche Bestandteile im Zytoplasma. Während beim Typ 1 zahlreiche Vesikel und Vakuolen vor allem im apikalen Zytoplasma vorkommen, sind beim Typ 2 elektronendichte Granula zu erkennen. Im Subtyp 3 sind dagegen sowohl Vakuolen als auch Granula im Zytoplasma zu finden. Kuhrau (1994) unterteilt die Hauptzellen nicht, Schick (2006) und Alkafafy (2005) machen wie ich eine Unterteilung in drei Subtypen. Die zahlreichen Vesikel und Vakuolen im apikalen Zytoplasma sprechen für aktive Mikropinozytose, folglich für Resorptionsprozesse. Auch Arrighi et al. (1994) erklären anhand des Zellaufbaus der zilientragenden Zellen und der Hauptzellen mit Mikrovillibesatz, die Fähigkeit des Epithels zur Absorption und Digestion der luminalen Flüssigkeit. Während in meinen Untersuchungen auch in den Hauptzellen der Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum nur schwach ausgeprägt sind, beschreiben Lopez et al. (1989) einen prominent entwickelten Golgi-Apparat. Der Zellkern der zilienlosen Hauptzellen ist längsoval und nimmt fast die gesamte Zellbreite ein. Wie Schick (2006) konnte auch ich eingelagertes Glykogen in Form von kleinen elektronendichten Granula in den Epithelzellen nachweisen.

Das unterschiedliche Verhalten der beiden Zellarten schon bei den konventionellen Färbungen weist auf ihre unterschiedlichen Funktionen hin. Die Kinozilien-tragenden Zellen sorgen für den Weitertransport der noch unbeweglichen Spermien. Ihre Kinozilien färben sich bei der Alcianblau-Färbung stark an, die Hauptzellen zeigen dagegen keine Reaktion. Wrobel (1990) beschreibt bei den zilienlosen Hauptzellen PAS-positive Granula im Zytoplasma, was auf eine große Resorptionsfähigkeit mit intrazellulärem Stoffabbau hindeutet. Ich konnte keine Granula in den Hauptzellen mit Hilfe der PAS-Färbung, jedoch wie schon beschrieben elektronenmikroskopisch nachweisen. Der Mikrovillibesatz, der die luminalen Oberfläche der Hauptzellen vergrößert ist ebenfalls ein Zeichen für die Fähigkeit zur Resorption.



### 1.1. Glykohistochemie

In den glykohistochemischen Untersuchungen, die mit Hilfe von 15 FITC-markierten (Con A, LCA, PSA, PNA, RCA, ECA, SBA, GSL I, SJA, DBA, WGA, WGAs, UEA I, PHA-E und PHA-L) und drei biotinylierten Lektinen (SNA, MAA I und VAA) durchgeführt wurden, waren zum Teil deutliche Unterschiede im Lektinbindungsmuster zwischen den Haupt- und Zilienzellen zu erkennen. Bei LCA reagieren beispielsweise die Zilienzellen inklusiv ihrer Kinozilien positiv, nicht aber die zilienlosen Hauptzellen. Da LCA ein Mannose/Glukose-bindendes Lektin ist, spricht das für ein Vorkommen dieser Zucker in den Zilienzellen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Alkafafy (2005) und Schick (2006). Sowohl die Haupt- als auch die Zilienzellen mit ihren Kinozilien zeigen eine deutlich bis starke Reaktion mit dem Mannose/Glukose-bindenden Lektin Con A. Die Annahme dass entsprechende Glykoproteine in den Zilienzellen, aber auch in den Hauptzellen vorkommen wird dadurch verstärkt. Dies entspricht den Ergebnissen der Untersuchungen am Nebenhoden des Pferdes von Kuhrau (1994) und Parillo (1998). Beim Nebenhoden des Hundes (SCHICK, 2006) reagieren ebenfalls die zilienlosen Zellen sowie die Zilienzellen in den Ductuli efferentes positiv. Unterschiede zeigen sich beim Nebenhoden der Katze (PREM, 1992) und des Rindes (ALKAFIFY, 2005). Bei beiden Tierarten reagieren nur die zilienlosen Hauptzellen positiv mit Con A, die Zilienzellen dagegen negativ. Das dritte der von mir untersuchten Mannose/Glukose-bindenden Lektinen PSA zeigt ebenfalls positive Reaktionen an den Hauptzellen und den Zilienzellen samt Zilien. Obwohl einige Lektine die gleiche Zuckerspezifität vorweisen, wie die Galaktose-bindenden Lektinen PNA, RCA und ECA zeigen sich vollkommen unterschiedliche Reaktionen am Epithel der Ductuli efferentes. Während von PNA und ECA keine Lektinbindungsstellen nachzuweisen waren, reagieren bei RCA die Haupt- und Zilienzellen in den Ductuli efferentes mit dem Lektin. Dies ist abweichend zu den bisherigen Untersuchungen über den Nebenhoden des Pferdes, bei denen PNA mit den Epithelzellen reagiert (KUHRAU, 1994; PARILLO et al., 1998). Beim Hund reagieren die Epithelzellen negativ auf RCA und PNA (SCHICK, 2006). Auch bei den N-Acetylgalaktosamin-bindenden Lektinen SBA, GSL I, SJA und DBA ergaben sich starke Unterschiede im Verteilungsmuster ihrer Bindungsstellen. Bei dieser Lektingruppe reagieren bis auf das SJA alle negativ in den Ductuli efferentes des Pferdes. SJA-

Bindungsstellen sind sowohl in den Haupt- also auch den Zilienzellen zu finden. Bei Parillo (1998) reagieren die Epithelzellen der Ductuli efferentes sowohl bei SBA als auch bei DBA positiv. GSL I zeigt bei den Untersuchungen von Kuhrau (1994) ebenfalls keine Reaktion. Roth (2011) erklärt die Bindung eines Lektins nicht nur in Abhängigkeit des Liganden, sondern auch die Beteiligung von nicht polaren Resten durch hydrophobe Wechselwirkungen und anionischen Gruppen sowie elektrostatischen Wechselwirkungen. Dies könnte eine Erklärung für die Unterschiede sowohl in der Anzahl der Bindungsstellen, als auch im Verteilungsmuster von Lektinen mit der gleichen Zuckerspezifität sein. WGA und WGAs als Vertreter der N-Acetylglukosamin-bindenden Lektine reagieren positiv bei meinen Untersuchungen an den Ductuli efferentes des Pferdes.

Vor allem mit WGAs stellt sich die Golgi-Zone der Hauptzellen deutlich dar. Der Golgi-Apparat spielt bei Sekretionsprozessen eine entscheidende Rolle durch Anlagerung und Abspaltung von Zuckerresten an Zwischenprodukten, die in Transportvesikel vom rauen endoplasmatischen Retikulum kommen und dann in entsprechende Vesikel abgegeben werden (HEES & SINOWATZ, 2000). Die deutlich positive Reaktion mit WGAs und auch Con A weist auf das Vorkommen von N-Acetylglukosamin und Mannose und/oder Glukose bei diesen Prozessen hin. Somit kann auch glykohistochemisch die Annahme, dass die Hauptzellen für Sekretions- und Resorptionsprozesse im Nebenhoden zuständig sind, bestätigt werden.

Der apikale Epithelsaum, der bei der Resorption und Sekretion von Bedeutung ist zeigt eine starke Fluoreszenz mit WGA und WGAs. Die bisherigen Untersuchungen am Nebenhoden des Pferdes kommen auf die gleichen Ergebnisse (KUHRAU, 1994; PARILLO et al., 1998). Auf LCA reagiert er ebenfalls, wie bei den Untersuchungen von Parillo (1998) positiv. Die deutlich bis starke Reaktion des apikalen Epithelsaums mit Con A, PSA und den bereits erwähnten Lektinen spricht für die Präsenz von Mannose und/oder Glukose und N-Acetylglukosamin in diesem Epithelbereich und damit deren Beteiligung an sekretorischen und resorptiven Prozessen.

Bei dem Fukose-bindenden Lektin UEA I kann ich, wie Kuhrau (1994) keine, Parillo (1998) dagegen positive Reaktionen an den Epithelzellen der Ductuli efferentes des Pferdes nachweisen. Auch Rauscher (1991) weist keine Bindungsstellen am Nebenhoden des Rindes mit diesem Lektin nach. Während

sich bei PHA-E die Haupt- und Zilienzellen schwach positiv zeigen, ist keine Reaktion mit PHA-L zu erkennen. Bei den Untersuchungen von Schick (2006) am Nebenhoden des Hundes reagieren diese beiden, nur an Oligosaccharide bindende Lektine im apikalen Epithelbereich.

Bei den Spermien im Lumen der Ductuli efferentes werden positive Reaktionen mit Con A sowohl beim Hengst (KUHRAU, 1994), als auch beim Bullen (RAUSCHER, 1991) und beim Kater (PREM, 1992) beschrieben. Meine Ergebnisse sind diesbezüglich entsprechend. Beim Hund ist abweichend keine Reaktion des Lumeninhalts auf Con A zu beobachten. Auch mit RCA reagieren sie bei meinen Untersuchungen positiv. Man kann also davon ausgehen, dass Glukose und/oder Mannose und Galaktose auf der Spermienmembran vorhanden sind.

## **1.2. Immunhistochemie**

Das Zytoskelett der Zellen von Eukaryonten setzt sich aus drei Komponenten, den Mikrofilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli zusammen. Es ist unter anderem bei Transportprozessen im Zytoplasma, Aufrechterhaltung der Zellform, bei Bewegungsvorgängen und der Zellteilung von Bedeutung. In meinen Untersuchungen waren zum Teil unterschiedliche Reaktionen in den Ductuli efferentes und den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodengangs zu erkennen. Das könnte auf eine Spezialisierung bestimmter Segmente hinweisen. In früheren Untersuchungen am Pferdenebenhoden wird eine eigene charakteristische Sekretion jeder Region am Nebenhoden nachgewiesen (FOUCHECOURT et al., 2000).

Das Protein  $\alpha$ -SMA, eine Isoform von Aktin, welches hauptsächlich in Zellen mit kontraktile Funktion zu finden ist, wird als nützlicher Marker für die Differenzierung von glatten Muskelzellen unter normalen und pathologischen Umständen herangezogen (SKALLI et al., 1989). Beim Nebenhoden vom Rind (ALKAFAY, 2005), vom Dromedar (ALKAFAY et al., 2011), vom Hund (EGGER, 2009) und vom Kater (RUFF, 2005) ist wie bei meinen Untersuchungen am Nebenhoden vom Pferd, die Muskelschicht und die Tunica media der Gefäße sowohl in den Ductuli efferentes, als auch im Ductus epididymidis stark positiv. Das Vimentin, welches zu den Intermediärfilamenten gezählt wird, zeigt an den Ductuli efferentes des Pferdes keine Reaktion mit dem Epithel oder dem

Lumeninhalt der Gänge. Die Muskulatur und das Gefäßendothel reagieren dagegen positiv. Die Ergebnisse von Schick (2006) an den Ductuli efferentes des Hundes und von Ruff (2005) decken sich mit meinen. Auf den Panzytokeratin-Antikörper, der sowohl gegen basische als auch saure Keratine gerichtet ist und somit Teil der Intermediärfilamente, reagiert das Zytoplasma der Zilienzellen beim Hund (SCHICK, 2006), Kater (RUFF, 2005) und in meinen Untersuchungen stark positiv. Bei dem Nachweis der Cytokeratine 5, 8, 14, 18 und 19 war das Zytoplasma der zilientragenden Zellen stark positiv. Philipp (2011) kommt auf entsprechende Ergebnisse bei ihren Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes. Abweichend von ihren Untersuchungen konnte ich positive Reaktionen der Mikrovilli-tragenden Hauptzellen, bis auf bei dem Cytokeratin 19-Antikörper nachweisen. Diese waren jedoch deutlich schwächer als die der Zilienzellen. Die unterschiedliche Anfärbung, spricht wie das Färbeverhalten in den konventionellen Färbungen und das unterschiedliche Verteilungsmuster der Lektinbindungsstellen für verschiedene Aufgabenbereiche der beiden Zellarten. Die Gefäße zeigen sich bei Cytokeratin 5, 14 und 18 positiv, der apikale Epithelsaum dagegen bei Cytokeratin 8 und 18. Der Nachweis von dem Cytokeratin 7 war negativ. Bei den Untersuchungen mit Laminin, einem nicht-kollagenhaltigen Glykoprotein, das einen Hauptbestandteil der Basalmembran bildet (ROHDE et al., 1979) reagiert diese, die Muskelschicht und die Gefäßmembrane in meinen Untersuchungen stark positiv. Dies wird ebenfalls beim Rind (ALKAFIFY, 2005), beim Hund (SCHICK, 2006) und dem Kater (RUFF, 2005) beobachtet. Ruff beschreibt zusätzlich noch eine unspezifische Färbung des subapikalen Zytoplasmas der Zilienzellen in den Ductuli efferentes. Am Nebenhoden des Hundes reagiert das apikale Zytoplasma der Epithelzellen mit COX I (PHILIPP, 2011), dagegen kann ich am Nebenhoden des Pferdes nur Reaktionen im Zytoplasma der Zilienzellen nachweisen. Auch dies spricht für unterschiedliche Vorgänge in den Haupt- und Zilienzellen.

## **2. Ductus epididymidis**

In der gesamten Länge des Nebenhodengangs ist das Epithel mehrreihig hochprismatisch. Während es beim Übergang von den Ductuli efferentes zum Initialsegment zu einer Zunahme der Epithelhöhe kommt, nimmt diese im Laufe des Ductus epididymidis ab. Je nach Segment besteht das Epithel aus verschiedenen Zelltypen. Die das Epithel umgebene Muskelschicht nimmt von proximal nach distal beträchtlich an Stärke zu.

### **2.1. Initialsegment**

Neben dem Anstieg der Epithelhöhe ist der Übergang von den Ductuli efferentes zum Initialsegment auch durch eine Zunahme des Lumendurchmessers von ungefähr 180 µm in den Ductuli efferentes auf durchschnittlich 505 µm im Initialsegment des Ductus epididymidis und dem für diesen Abschnitt charakteristischen sternförmigen Lumen gut zu erkennen. Diese Lumenform kommt durch das Epithel, welches in diesem Abschnitt gewellt und am höchsten ist, zustande. Es beinhaltet im Initialsegment drei Zellarten, die Haupt-, Basal- und Apikalzellen. Die Basalzellen liegen der Basallamina direkt auf und bilden dort eine geschlossene Kette. Elektronenmikroskopisch ist in den kleinen Basalzellen ein runder, zentral gelegener Zellkern, der von wenig Zytoplasma umgeben wird zu erkennen. Der Golgi-Apparat ist klein und kommt meist im basalen Zytoplasma vor. Auch das endoplasmatische Retikulum ist wenig ausgeprägt. Mitochondrien kommen im gesamten Zytoplasma vor. Sowohl Philipp (2011), als auch Kuhrau (1994) beschreiben die Basalzellen im Nebenhodengang entsprechend zu meinen Beobachtungen als Zellorganell-arm. Dies weist auf eine weniger wichtige Rolle in Resorptions- und Sekretionsprozessen als die Hauptzellen hin. Im Initialsegment sind im basalen Zytoplasma Vakuolen zu beobachten. Die Kontaktfläche der Basalzellen zur Basallamina ist breit. Philipp (2011) beschreibt Zellausläufer der Basalzellen in Richtung luminaler Epitheloberfläche. Diese konnten auch in meinen Untersuchungen dargestellt werden. Shum et al. (2008 und 2009), stellen bis ans Lumen reichende Basalzellausläufer am Nebenhoden der Ratte mittels 3D-Laser-Scanning-Mikroskopie dar und weisen ihre Beteiligung an der luminalen pH-Wert-Regulation nach.

Die hochprismatischen Hauptzellen tragen Stereozilien, die sich wiederum bei der Alcianblau-Färbung und der PAS-Reaktion positiv darstellen und die Resorption von luminaler Flüssigkeit zur Aufgabe haben. Elektronenmikroskopisch ist eine Abnahme ihrer Länge nach proximal zu erkennen. Im Initialsegment reichen sie durchschnittlich  $12,4 \mu\text{m}$  ( $\pm 3,4 \mu\text{m}$ ) ins Lumen. Im apikalen Zytoplasma sind zahlreiche Vesikel und Vakuolen zu finden, welche Zeichen für aktive Mikropinozytose sein können. Es ist ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat in den Hauptzellen zu erkennen. Dieser ist wie bereits erwähnt, wichtig für den Um- und Aufbau von sekretorischen Proteinen oder Membranproteinen zum Beispiel durch die enzymatische Abspaltung und Abkopplung von Zuckerresten (HEES & SINOWATZ, 2000). Das endoplasmatische Retikulum, welches nicht nur zur intrazellulären Kompartimentierung und dadurch zur Vereinbarung vieler miteinander unverträglicher Reaktionsabläufe auf engem Raum beiträgt, sondern wie der Golgi-Apparat eine zentrale Rolle in der Biosynthese von wichtigen Makromolekülen spielt (HEES & SINOWATZ, 2000), ist in den Hauptzellen aller Nebenhodenabschnitten, besonders aber in den vorderen, deutlich ausgeprägt. Der Hauptzellkern ist längsoval und steht immer senkrecht zur Basallamina. Er enthält ein bis zwei Nukleoli. Während Lopez et al. (1989) Kerneinschlüsse in den Hauptzellkernen des equinen Nebenhodenepithels beobachten, konnte ich in meinen Untersuchungen diese nicht nachweisen.

Neben Haupt- und Basalzellen sind im Initial- und Mittelsegment des equinen Ductus epididymidis Apikalzellen vorhanden. Die Apikalzellen ähneln bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen sehr den Hauptzellen, ihre Kerne liegen jedoch in der apikalen Epithelhälfte und dadurch deutlich oberhalb der Hauptzellkerne. Das Zytoplasma der Apikalzellen ist laut Palacios (1991) reich an Mitochondrien. Ich konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen Mitochondrien-reiche Zellen mit kleinerem Zellkern als der der Hauptzellen beobachten. Robaire & Hinton (2002) vermuten bei diesen Zellen die Fähigkeit zur Endozytose.

Die sich dem Epithel anschließende Basallamina liegt in Wellen, was ihre Kontaktfläche zum Epithel vergrößert und trennt dieses von den sich anschließenden Muskelzellschichten. Spermien konnten im Lumen des Initialsegments nur selten beobachtet werden.

### 2.1.1. Glykohistochemie

Im Initialsegment ist bei den Lektinen Con A, PSA, WGA, WGAs, PHA-L und SNA eine starke Fluoreszenz im Epithel zu erkennen. Es ist der einzige Nebenhodenabschnitt bei dem Reaktionen mit PHA-L nachweisbar sind.

Vor allem die Basalzellen stellen sich, bis auf bei PHA-L stark positiv dar. Somit konnten dort die Zuckerstrukturen Mannose und/oder Glukose, N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen von Kuhrau (1994) sind die Basalzellen ausschließlich mit DBA, ebenfalls einem N-Acetylgalaktosamin-bindenden Lektin deutlich positiv. Bei den anderen von ihr getesteten Lektinen zeigen sie keine oder nur eine schwache Reaktion. Beim Nebenhoden des Katers (PREM, 1992) reagieren sie mit Con A und WGA positiv. Beim Nebenhoden des Rindes (ALKAFAY, 2005) sind die Ergebnisse bezüglich der verschiedenen Lektinbindungsaffinitäten an den Basalzellen meinen Resultaten sehr ähnlich. Hier reagieren sie neben Con A, WGA und PSA noch mit dem dritten der Mannose/Glukose-bindenden Lektinen, dem LCA. Beim Hund werden positive Reaktionen der Basalzellen bei den Lektinen MAA I (PHILIPP, 2011) und Con A (SCHICK, 2006) beschrieben.

Bis auf bei Con A, bei dem sich sowohl das Zytoplasma als auch die Golgi-Zone der Hauptzellen positiv darstellt, reagiert bei allen anderen oben erwähnten Lektinen nur die Golgi-Zone positiv in meinen Untersuchungen, wodurch hier von der Existenz von Mannose und/oder Galaktose, N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin ausgegangen werden kann. Diese deutliche Darstellung des Golgi-Apparates spricht für eine sehr hohe sekretorische Aktivität im Initialsegment. Bei älteren Untersuchungen am Pferdenebenhoden zeigt sich ebenfalls eine verstärkte Reaktion des Golgi-Apparates, das Zytoplasma reagiert zusätzlich jedoch auch (KUHRAU, 1994). Bei Parillo (1997), der nur zwischen Glykokalix und Zytoplasma der Hauptzellen unterscheidet, reagiert im Caput epididymidis das Zytoplasma mit allen von ihm getesteten Lektinen außer dem PNA. Beim Hund zeigen sich sowohl Zytoplasma als auch Golgi-Apparat mit den meisten Lektinen positiv (SCHICK, 2006).

Die Stereozilien der Hauptzellen reagieren mit den gleichen Lektinen wie die Hauptzellen: Con A, PSA, WGA, WGAs, PHA-L und SNA. Ebenfalls deutlich positiv verhält sich der apikale Epithelsaum in meinen Untersuchungen, der wie

der Golgi-Apparat in die Sekretionsprozesse involviert ist.

Da die Basallamina nur mit WGA, WGAs und schwach mit SNA reagiert scheint N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin hier vorhanden zu sein. Kuhrau (1994) weist wie Prem (1992) ebenfalls Bindungsstellen der Basallamina mit WGA zusätzlich aber noch mit Con A nach. Auch beim Rind reagiert sie nur mit WGA (ALKAFIFY, 2005). Die sich der Basallamina anschließende Muskelschicht und die Gefäße im Bindegewebe reagieren mit LCA, einem Mannose/Glukose-bindenden Lektin.

Bei RCA, einem Galaktose-bindenden Lektin zeigen sich die Spermien im Lumen des gesamten Nebenhodengangs positiv. Man kann somit davon ausgehen, dass Galaktose auf der Spermienoberfläche durchgehend vorhanden ist. Bei ECA, PNA und VAA, welche ebenfalls an Galaktose binden, sind keine Reaktionen der Spermien oder des Epithels zu erkennen. Die von Roth (2011) beschriebene Abhängigkeit der Lektinbindung nicht nur vom Glykan, sondern auch von nicht polaren Resten durch hydrophobe Wechselwirkungen und anionischen Gruppen sowie elektrostatischen Wechselwirkungen, kann auch hier die unterschiedliche Bindung der Lektine, trotz gleicher Zuckerspezifität erklären.

### **2.1.2. Immunhistochemie**

Die Muskelschicht, die das Epithel des Ductus epididymidis umgibt reagiert beim Rind (ALKAFIFY, 2005), beim Dromedar (ALKAFIFY et al., 2011), beim Hund (SCHICK, 2006), beim Kater (RUFF, 2005) und bei meinen Untersuchungen stark positiv mit  $\alpha$ -SMA-Antikörpern. Ansonsten reagiert nur die Tunica media der Gefäße im Bindegewebe positiv. Der Nachweis von Vimentin ist in diesem Abschnitt vor allem in Bezug auf die positiv reagierenden Basalzellen von Interesse. Es können dadurch ihre Zellausläufer beobachtet werden. Neben der Muskelschicht und den Gefäßendothelien reagiert auch das Bindegewebe positiv. Schick (2006) beschreibt beim Nebenhoden des Hundes entsprechende Reaktionen und auch beim Kater reagieren die Basalzellen und die Muskelschicht stark positiv (SANCHEZ et al., 1998). Der Panzytokeratin-Antikörper färbt sowohl am Nebenhoden des Hundes (PHILIPP, 2011) als auch bei meinen Untersuchungen die Basalzellen positiv an. Bei den Cytokeratin-Antikörpern 5, 8, 14, 18 und 19 zeigen diese Zellen ebenfalls positive Reaktionen. Bei den Antikörpern gegen Cytokeratin 8, 14 und 18 reagieren neben dem



Zytoplasma der Basalzellen auch deren Zellkerne positiv. Auch durch diese Untersuchungen sind die bis ans Ganglumen reichenden Zellausläufer der Basalzellen gut zu erkennen. Über die Funktion der Basalzellen ist man sich bis heute nicht einig. Während man lange Zeit davon ausging, dass die Basalzellen nur im basalen Epithel liegen, die luminale Oberfläche dadurch nicht erreichen und sie folglich auch nicht direkt an der Bildung des im Lumen herrschenden Milieus zur epididymalen Spermienreifung beteiligt sind, haben Shum et al. (2008 und 2009) all das mit der erstmaligen Darstellung der Basalzellausläufer am Nebenhoden der Ratte wiederlegt. Sie bewiesen, dass die Basalzellen an der pH-Wert-Regulation des luminalen Milieus beteiligt sind. Die Basallamina reagiert auf den Cytokeratin 8-Antikörper positiv, der apikale Epithelsaum auf den Antikörper gegen das Cytokeratin 18. Mit dem Cytokeratin 18-Antikörper weisen sowohl Haupt- als auch Apikalzellen schwach positive Reaktionen auf. Beim Hund (PHILIPP, 2011) zeigen die Cytokeratine 5, 8, 14 und 19 ebenfalls positive Reaktionen mit den Basalzellen und ihre Zellausläufer werden erkennbar. Entsprechend zu den Untersuchungen am Rind (ALKAFIFY, 2005), an Huhn, Ente und Taube (ABD-ELMAKSUD, 2009), am Hund (SCHICK, 2006) und am Kater (RUFF, 2005) reagieren auch bei meinen Untersuchungen die Basallamina des Epithels, die der Gefäße und die der Muskelzelllagen positiv beim immunhistochemischen Nachweis von Laminin. Im Initialsegment ist das Zytoplasma der Basalzellen bei dem COX I-Nachweis positiv. Dies stimmt mit den Arbeiten von Shum (2008 und 2009) überein, in denen COX I-Antikörper als Basazellmarker verwendet werden. Ansonsten reagieren wie schon in den Ductuli efferentes nur die Gefäße stark positiv.

## **2.2. Mittelsegment**

Im Mittelsegment ist das Ganglumen nicht mehr sternförmig, sondern rund mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 311  $\mu\text{m}$  ( $\pm 28 \mu\text{m}$ ). Während in den Ductuli efferentes und im Initialsegment nur vereinzelt Spermien und Zellfragmente im Lumen waren, sind hier schon deutlich mehr Spermien zu erkennen. Ihr Aufbau in Kopf, Mittelstück und Schwanz war im Elektronenmikroskop deutlich erkennbar. Das Epithel verliert an Höhe (57  $\mu\text{m}$ ), es sind jedoch immer noch alle drei Epithelzellarten zu beobachten.

Wie schon in früheren Arbeiten am Nebenhoden des Pferdes beschrieben (ARRIGHI et al., 1993) verändern sich die Form der Basalzellen auch

ultrastrukturell im Laufe des Nebenhodens kaum. Sie reagieren bei der PAS-Färbung stark positiv, wodurch auch hier bis ans Lumen reichende Zellausläufer zu erkennen sind. Auch Philipp (2011) beschreibt am Nebenhoden des Hundes ebenfalls bis ans Lumen reichende Zellausläufer der Basalzellen. Am Nebenhoden der Ratte wurden die Zellausläufer der Basalzellen zuerst beobachtet und ihre Beteiligung an der pH-Wert-Regulierung im Lumen nachgewiesen (SHUM et al., 2008; SHUM et al., 2009). Hierfür wurden COX I-Antikörper und Claudin I zur Darstellung der Basalzellen verwendet.

Die Hauptzellen tragen im Mittelsegment durchschnittlich  $17,1 \mu\text{m}$  ( $\pm 2,8 \mu\text{m}$ ) lange Stereozilien. Im apikalen Zytoplasma sind Vesikel und Vakuolen zu finden. Diesen schließt sich nach basal eine Zone mit elektronendichten Granula an. Der Zellkern, das endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat der Hauptzellen zeigen sich wie im Initialsegment. Folglich kann auch hier von Sekretion und Resorption der luminalen Flüssigkeit ausgegangen werden.

Licht- und elektronenmikroskopisch sind bei den Apikalzellen des Mittelsegments keine Unterschiede zu denen des Initialsegments zu erkennen. Ihre Anzahl nimmt dagegen ab. Dies beschreibt auch Kuhrau (1994).

Neben Lymphozyten sind im Mittelsegment auch Makrophagen zu beobachten. Diese sind bei der PAS-Färbung mit Amylasevorbehandlung basal zu erkennen.

Die Verbindung der Epithelzellen erfolgt im gesamten Ductus epididymidis im apikalen Epithelbereich über „junctional complexes“ und im basalen Epithelbereich über Invaginationen der benachbarten Zellmembrane. Auch Schick (2006) beschreibt diese Art der Verbindungen am Nebenhodenepithel des Hundes. „Junctional complexes“, welche zu den indirekten Zellkontakten gezählt werden, entstehen durch das unmittelbare Nebeneinander von „tight junctions“ und Zonulae adhaerentes. Die Zonulae adhaerentes dienen vor allem für die mechanische Stabilität (LIEBICH, 2004), verlaufen bandförmig im apikalen Bereich um Epithelzellen und sorgen für einen 15 - 20 nm breiten Interzellularspalt. Im Bereich der „tight junctions“ verschmelzen die benachbarten Zellmembrane dagegen, sodass in diesen Bereichen kein Interzellularspalt mehr vorhanden ist. Sie sind für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion von Epithelien wichtig (HEES & SINOWATZ, 2000). Invaginationen, die bei meinen Untersuchungen im basalen Epithelbereich vorkommen, gehören laut Liebich

(2004) zu den direkten Zellkontakten und treten allgemein an der Zellbasis als unregelmäßige Einfaltungen, Einziehungen oder Verzahnungen auf.

### **2.2.1. Glykohistochemie**

Das Mittelsegment des Ductus epididymidis reagiert in meinen Untersuchungen deutlich mit den Lektinen Con A, LCA, PSA, WGA, WGAs und SNA.

Die Basalzellen weisen mit diesen Lektinen durchgehend stark positive Reaktionen auf, wodurch von der Anwesenheit von Mannose und/oder Glukose, N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin in den Basalzellen ausgegangen werden kann. Kuhraus (1994) Ergebnisse sind entsprechend. Über die Funktion der Basalzellen gibt es, wie bereits beschrieben seit Jahre verschiedene Theorien. Die Darstellbarkeit dieser Zellen mittels Lektinen kann sowohl für den Abbau resorbierter Moleküle, als auch für die Beteiligung an der Sekretion sprechen. Der Golgi-Apparat, der bei Sekretionsprozessen von großer Bedeutung ist, stellt sich dagegen in den Basalzellen nicht verstärkt dar.

Die Hauptzellen und ihre Stereozilien reagieren positiv im Mittelsegment. Das unterschiedliche Verteilungsmuster an Lektinbindungsstellen in den Stereozilien verschiedener Nebenhodenabschnitte ist von Resorptionsvorgängen abhängig. Eine Spezialisierung bezüglich der Resorption ganz bestimmter Substanzen in den verschiedenen Segmenten des Ductus epididymidis beschreibt Sinowatz (1981) mit der Präsenz spezifischer Enzyme in den Stereozilien der einzelnen Gangabschnitte.

Im Mittelsegment zeigt vor allem die Golgi-Zone der Hauptzellen verstärkte Fluoreszenz. Man kann also auch in diesem Nebenhodenabschnitt von einer starken Sekretion ausgehen und die Lektinbindungen damit erklären, dass die Bindungspartner der positiven Lektine Teile der dort stattfindenden Glykoproteinsynthese sind. Auf dieses Ergebnis kommt auch Parillo (1997), der im Corpus epididymidis zwischen Zytoplasma und Golgi-Zone der Hauptzellen unterscheidet. Bei den Untersuchungen am Pferdenebenhoden von Kuhrau (1994) und am Hundenebenhoden von Schick (2006) sind keine deutlicheren Reaktionen der Golgi-Zone gegenüber dem Zytoplasma zu erkennen.

Der apikale Epithelsaum zeigt sich wie schon im Initialsegment deutlich positiv. Dies kann beim Hund (SCHICK, 2006) nicht beobachtet werden.

Die Spermien im Lumen reagieren in meinen Untersuchungen ebenfalls mit einigen Lektinen positiv. Neben Con A, LCA, WGA, WGAs und SNA sind sie auch mit RCA positiv, das ansonsten keine Reaktionen im Mittelsegment vorweist. Dieses zum Teil von den Spermien im Initialsegment unterschiedliche Verteilungsmuster der Lektinbindungsstellen, kann für eine Weiterentwicklung der Spermien im Rahmen der epididymalen Reifung sprechen. Auch beim Kater zeigen sich die Spermien mit Con A und WGA (PREM, 1992), beim Hund zusätzlich mit UEA I, PNA und GSL I (SCHICK, 2006) positiv.

Die Basallamina reagiert in diesem Abschnitt nur noch mit WGA. Wie im Initialsegment ist sie bei Kuhrau (1994) und Prem (1992) auch im Mittelsegment zusätzlich noch mit Con A positiv. Bei Alkafafy (2005) zeigt sich ebenfalls nur mit WGA eine Reaktion. Da WGA an N-Acetylglukosamin und Sialinsäure bindet weist dieses Ergebnis auf einen hohen Gehalt dieser Bindungspartner in der Basallamina hin.

### **2.2.2. Immunhistochemie**

Auch im Mittelsegment reagieren die Muskelschicht und die Tunica media der Gefäße im Lumen positiv auf  $\alpha$ -SMA. Dies entspricht den Ergebnissen von Alkafafy (2005 und 2009) am Nebenhoden des Rindes und des Dromedars, von Ruff (2005) am Nebenhoden des Katers und von Schick (2006) am Nebenhoden des Hundes. Der Nachweis von Vimentin ist entsprechend zu dem im Initialsegment. Beim Nachweis von Panzytokeratin und den verschiedenen Cytokeratinen ist die Reaktion der Basalzellen deutlich positiv. Auch in diesem Abschnitt sind dadurch Zellausläufer erkennbar. Dies deckt sich größtenteils mit den Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes (SCHICK, 2006; PHILIPP, 2011). Beim Laminin sind wie im Initialsegment die Basallamina des Epithels, der glatten Muskelzellen und der Gefäße sowohl in meinen Untersuchungen, als auch in denen von Abd-Elmaksoud (2009) am Nebenhoden von Huhn, Ente und Taube, sowie von Ruff (2005) am Nebenhoden des Katers und Schick (2006) am Nebenhoden des Hundes stark positiv. Bei dem COX I-Nachweis reagiert das Zytoplasma der Basalzellen schwächer als im Initialsegment. Die Gefäße bleiben stark positiv gefärbt.

### 2.3. Terminalsegment

Das niedrige Epithel des Terminalsegments (35 µm) zeigt durch die in das Lumen reichenden Ausbuchtungen ein charakteristisches Bild. Es besteht aus zwei Zellarten, den Haupt- und den in ihrer Anzahl deutlich gesunkenen Basalzellen. Während im Initialsegment noch von einem nahezu ausgeglichenen Verhältnis zwischen Haupt- und Basalzellen ausgegangen werden kann, ist das Verhältnis zwischen diesen Zellen im Terminalsegment nur mehr bei 3 : 1. Der Basalzellkern ist längsoval und im Zytoplasma sind neben den Vakuolen hier auch Lysosome nachweisbar. Die im Initial- und Mittelsegment breite Kontaktfläche der Basalzellen zur Basallamina, wird im Terminalsegment durch Ausläufer der Hauptzellen eingeschränkt. Philipp (2011) beschreibt Zellausläufer der Basalzellen in Richtung luminaler Epitheloberfläche. Diese konnten auch in meinen Untersuchungen dargestellt werden, jedoch waren die des Terminalsegments nicht bis zum Lumen zu verfolgen.

Die Hauptzellen tragen auf ihrer luminalen Oberfläche Stereozilien, dessen Länge im Ductus epididymidis von proximal nach distal abnimmt. Während sie im Initialsegment durchschnittlich 12,4 µm ins Lumen reichen, haben die Stereozilien der Hauptzellen im Terminalsegment nur eine Länge von 7,3 µm ( $\pm 2,3$  µm). Die Anzahl der Vesikel und Vakuolen im Zytoplasma der Hauptzellen nimmt nach distal ab, sodass im Terminalsegment deutlich weniger beobachtet werden. Dies und auch die abnehmende Länge der Stereozilien, können Zeichen für eine Verringerung der Resorptions- und Sekretionsprozesse im Laufe des Nebenhodengangs sein. Beim Nebenhoden des Rindes werden entsprechende Beobachtungen beschrieben (SINOWATZ, 1981). Der gut ausgebildete Golgi-Apparat stellt sich im Terminalsegment im Vergleich zu den beiden vorhergehenden Abschnitten kompakter und weniger stark ausgeprägt dar. Da dieser, wie bereits mehrfach beschrieben wichtig für den Um- und Aufbau von sekretorischen Proteinen oder Membranproteinen ist (HEES & SINOWATZ, 2000), kann auch die geringere Ausprägung des Golgi-Apparats im Terminalsegment die Hypothese, dass die Hauptaufgabe des Terminalsegments in der Speicherung der Spermien und nicht in der Sekretion liegt, unterstützen.

Das Lumen des Nebenhodengangs ist mit einem Durchmesser von bis zu 1000 µm in diesem Abschnitt am weitesten und mit zahlreichen Spermien gefüllt. Das Terminalsegment sorgt für ein Milieu indem die Spermien längere Zeit

lebensfähig gelagert werden können. Die dortige Aufenthaltsdauer beträgt von zwei bis drei Tagen bei sexuell aktiven Hengsten bis zu zehn Tagen bei sexuell inaktiven Hengsten (AURICH, 2005). Die große Anzahl der Spermien und die Lumenweite sprechen auch beim Pferd für die Annahme, dass das Terminalsegment als Speicherort dient. In der Goldner-Färbung meiner Untersuchungen stellt sich eine Bindegewebsschicht zwischen der Basallamina des Epithels und der Muskelschicht dar. Das stimmt mit den Ergebnissen von Kuhrau (1994) überein. Bei dem Nebenhoden von Hund (SCHICK, 2006; PHILIPP, 2011), Kater (RUFF, 2005) und Rind (ALKAFIFY, 2005) wird keine Bindegewebsschicht zwischen Epithel und Muskulatur beschrieben. Die anschließende Muskelzellschicht hat sich im Laufe des Nebenhodengangs bis zum Terminalsegment deutlich verstärkt. Auch bei den anderen Tierarten ist eine solche Zunahme der Muskelzelllagen im Nebenhodenverlauf bekannt. Während sich die Muskulatur des Initial- und Mittelsegments selbständig auf Dehnungsreize kontrahiert, zieht sich die starke Muskelschicht des Terminalsegments bei der Ejakulation reflektorisch zusammen (WROBEL, 1990).

### **2.3.1. Glykohistochemie**

Im Terminalsegment reagieren die Basalzellen bei meinen Untersuchungen mit Con A, PSA, WGA, WGAs, SNA und LCA durchgehend stark positiv. Somit kann auch hier von der Existenz von Mannose und/oder Glukose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin ausgegangen werden. Auch Kuhrau (1994) weist positive Reaktionen der Basalzellen mit Con A und WGA sowie GSL I und MPA nach. Beim Nebenhoden des Katers werden ebenfalls Bindungsstellen der Basalzellen mit Con A und WGA beschrieben (PREM, 1992). Beim Rind reagiert zudem noch LCA und GSL I mit den Basalzellen (ALKAFIFY, 2005). Durch die gleiche Zuckerspezifität der Lektine werden obwohl bei diesen Tierarten andere Lektine positiv reagieren, keine anderen Zuckerstrukturen in den Basalzellen des Nebenhodens nachgewiesen.

Die Hauptzellen zeigen ausschließlich mit Con A eine positive Reaktion. Der Golgi-Apparat tritt nicht verstärkt in Erscheinung. Man kann also davon ausgehen, dass die Sekretionsvorgänge hauptsächlich in den vorderen Abschnitten des Nebenhodens eine Rolle spielen.

Die Stereozilien der Hauptzellen reagieren dagegen zusätzlich mit WGA, WGAs,

SNA und LCA. Da sie vor allem für die Resorption von Bedeutung sind, kann von Resorptionsvorgängen mit Beteiligung der Zuckerstrukturen Mannose und/oder Glukose, N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin im Terminalsegment ausgegangen werden. Beim Rind ist sowohl das Zytoplasma, als auch die Stereozilien der Hauptzellen neben Con A auch mit PSA und WGA positiv (ALKAFAFY, 2005). Die Hauptzellen und die Stereozilien zeigen sich beim Hund mit den Lektinen LCA, PSA, Con A, WGA, PNA und GSL I positiv. Nur die Stereozilien reagieren mit WGA, PHA-E und -L (SCHICK, 2006).

Der apikale Epithelsaum weist im Terminalsegment des Pferdenebenhodens meiner Untersuchungen eine zum Teil starke Fluoreszenz auf. Da dieser unter anderem für die Resorption von Bedeutung ist, stärkt das die Annahme von resorptiven Prozessen im Terminalsegment. Beim Hund reagiert er dagegen deutlich weniger (SCHICK, 2006).

Die im Lumen vorkommenden Spermien zeigen Bindungsstellen mit Con A, WGA, WGAs, SNA und LCA. Bei Untersuchungen am Spermium des Pferdes reagieren ebenfalls Spermien der Cauda epididymidis mit Con A und WGA. Das unterschiedliche Verteilungsmuster der Lektinbindungen an den Spermien im Laufe des Nebenhodens wird dabei mit der Veränderung der kohlenhydrathaltigen Membranstrukturen während der epididymalen Spermienreifung erklärt (WIELAND, 1994).

In einigen Arbeiten wird das unterschiedliche Bindungsverhalten der Lektine in direkten Zusammenhang mit der Art der Fixierung gebracht. Es werden unterschiedliche Ergebnisse durch die Gewebefixierung mit Bouin'scher Lösung und Formalin beschrieben. Bouin fixierte Schnitte reagieren besser mit Lektinen als Formalin fixierte Schnitte (SODERSTROM et al., 1984). Während gepuffertes Formaldehyd und Glutaraldehyd einzeln oder in Kombination sowohl das Gewebe gut erhalten als auch für eine gute Bindung verschiedener Lektine mit zellulären und extrazellulären Glykanen sorgen, führt die Osmiumtetroxid-Fixierung zu keiner erfolgreichen Lektin-Markierung (ROTH, 2011). In meinen Untersuchungen wurden nur Bouin-fixierte Schnitte für die glykohistochemischen Untersuchungen verwendet. Nur so kann eine Vergleichbarkeit gewährleistet werden. Roth (2011) erläutert zudem noch die Bedeutung der Gewebseinbettung für die Lektinbindung. Aldehyd-fixiertes und anschließend in Paraffin eingebettetes Gewebe kann beispielsweise über Jahre archiviert und anschließend

noch für glykohistochemische Untersuchungen verwendet werden. Auch in meiner Arbeit erfolgte die Einbettung in Paraffin. Die Verwendung verschiedener Markierungen nimmt ebenfalls Einfluss auf die Lektinbindungsbereitschaft. So haben FITC-markierte Lektine gegenüber solchen mit HRP eine höhere Sensitivität. Manche Lektine, wie das PNA zeigen nur FITC-markiert, nicht aber mit HRP Reaktionen mit ihren Liganden (WATANABE et al., 1981). In meiner Arbeit wurden sowohl FITC-markierte, als auch biotinylierte Lektine verwendet. Da aber die Lektine nur mit der einen oder der anderen Markierung vorlagen, kann ich keine Aussage über den Einfluss der Marker auf die Lektinbindung treffen. Die Zellkerne wurden zur besseren Darstellung mit DAPI gefärbt. Auch die Schnittstärke beeinflusst das Ergebnis von glykohistochemischen Untersuchungen. Der Grad der Strukturauflösung ist umgekehrt proportional zur Schnittstärke, so sind mit Semidünnschnitten (0,1 – 1,0  $\mu\text{m}$ ) gegenüber Paraffin-Schnitten ( $\geq 5 \mu\text{m}$ ) bessere Ergebnisse zu erzielen (ROTH, 2011). Da eine Vielzahl von Faktoren den Nachweis von Lektinbindungsstellen beeinflusst, ist bei dem Vergleich verschiedener Arbeiten bezüglich Lektinbindungsstellen nicht nur mit speziesspezifischen Unterschieden zu rechnen.

Durch die verwendeten Lektine konnte ich im Nebenhoden des Pferdes Mannose, Glukose, Galaktose, N-Acetylgalaktosamin, N-Acetylglukosamin und komplexere Kohlenhydrate nachweisen.

### **2.3.2. Immunhistochemie**

Wie in den vorherigen Nebenhodenabschnitten reagiert  $\alpha$ -SMA ausschließlich mit der Muskelschicht des Nebenhodenganges und der Gefäße. Die Zunahme der Dicke der Muskelzellschicht von 5  $\mu\text{m}$  in den Ductuli efferentes auf teilweise bis zu 115  $\mu\text{m}$  im Terminalsegment, die in den konventionellen Färbungen schon zu erkennen war, kann durch den  $\alpha$ -SMA-Nachweis noch deutlicher dargestellt werden. Durch den Vimentin-Antikörper stellt sich in diesem Abschnitt der apikale Epithelsaum stark positiv dar. Das Zytoplasma der Hauptzellen reagiert schwach positiv und die Basalzellen deutlich. Die Muskelschicht des Nebenhodenganges und der Gefäße verhalten sich wie im Initial- und Mittelsegment positiv. Während beim Hund (SCHICK, 2006) keine Reaktion der Haupt- und Basalzellen mit dem Vimentin-Antikörper zu erkennen waren, beschreibt Ruff (2005) beim Nebenhoden des Katers entsprechend zu meinen Untersuchungen, positive Reaktionen der Basalzellen mit dem Antikörper gegen



das Intermediärfilament Vimentin. Bei meinen Untersuchungen bezüglich der Intermediärfilament-Familie der Cytokeratine fällt vor allem die Reaktion des apikalen Epithelsaums im Terminalsegment auf. Dieser reagiert beim Nachweis des Panzytokeratins, sowie aller getesteten Cytokeratine, außer dem komplett negativen Cytokeratin 7. Das Zytoplasma und die Kerne der Basalzellen reagieren bei Cytokeratin 8, 14 und 18. Bei den Cytokeratinen 5 und 19 reagiert nur ihr Zytoplasma. Philipp (2011) beschreibt ebenfalls eine Reaktion der Zellkerne bei dem Cytokeratin 8. Bei Untersuchungen am Nebenhoden des Menschen kann eine Zunahme der Cytokeratin-Bindungsstellen beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine Anpassung des Zytoskeletts auf die mechanische Beanspruchung des Nebenhodens vor allem im distalen Bereich während der Ejakulation (PALACIOS et al., 1993). Auch in meinen Untersuchungen waren mehr Bindungsstellen für Cytokeratine im Terminalsegment gegenüber den anderen Nebenhodenabschnitten zu beobachten. Neben der positiven Reaktion der Basallamina des Epithels, der Muskulatur und der Gefäße, zeigen auch der apikale Epithelsaum und das Zytoplasma der Hauptzellen eine schwach positive Reaktion mit dem Laminin-Antikörper. Die Bindegewebsschicht, die das Epithel von der Muskelschicht in diesem Abschnitt trennt, ist durch ihre ausbleibende Reaktion gut zu erkennen. Der immunhistochemische Nachweis von COX I nimmt weiter ab. Während die Gefäße weiterhin stark positiv reagieren zeigen sich die Basalzellen nur noch schwach positiv. Auch Philipp (2011) weist beim Nebenhoden des Hundes nur eine schwache Reaktion in der Cauda epididymidis nach.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nebenhoden von 20 klinisch gesunden Pferden unterschiedlichen Alters und Rassen untersucht. Licht- und elektronenmikroskopisch wurde die Morphologie und Ultrastruktur analysiert. Durch glykohistochemische Techniken wurde die Verteilung von Lektinbindungsstellen dargestellt. Weiter wurden immunhistochemische Untersuchungen zur genaueren Analyse des Zytoskeletts der Zellen des equinen Nebenhodens durchgeführt. Der Aufbau des Nebenhodens vom Pferd entspricht grundsätzlich dem der anderen Säugetiere. Die Einteilung in vier Abschnitte, den Ductuli efferentes, dem Initialsegment, dem Mittelsegment und dem Terminalsegment erfolgt aufgrund histologischer und zytologischer Aspekte.

Das Epithel der Ductuli efferentes setzt sich aus Kinozilien-tragenden Zellen und Hauptzellen mit Mikrovillibesatz zusammen. Die Hauptzellen lassen sich, abhängig von der Anwesenheit von Vakuolen und Granula in drei Subtypen einteilen. Während die Hauptzellen die Resorption und Sekretion luminaler Flüssigkeit als Aufgabe haben, ist die Funktion der Zilienzellen der Weitertransport der Spermien. Das Epithel des Ductus epididymidis hat in den einzelnen Abschnitten eine charakteristische Morphologie. Haupt- und Basalzellen kommen in allen Abschnitten, im Initial- und Mittelsegment zusätzlich noch Apikalzellen vor.

Die histochemischen Untersuchungen über die Verteilung von Kohlenhydraten im Nebenhoden des Pferdes wurden mit FITC-konjugierten und biotinylierten Lektinen durchgeführt. Die FITC-markierten Lektine waren Canavalia ensiformis Agglutinin (Con A), Lens culinaris Agglutinin (LCA), Pisum sativum Agglutinin (PSA), Arachis hypogaea Agglutinin (PNA), Ricinus communis Agglutinin (RCA), Erythrina cristagalli Agglutinin (ECA), Glycine max Agglutinin (SBA), Griffonia simplicifolia Agglutinin I (GSL I), Saphora japonica Agglutinin (SJA), Dolichos biflorus Agglutinin (DBA), Triticum vulgare Agglutinin (WGA), Triticum vulgare Agglutinin succinyliert (WGAs), Ulex europaeus Agglutinin I (UEA I), Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E) und Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L). Die Lektine Maackia amurensis Agglutinin I (MAA I), Sambucus nigra Agglutinin (SNA) und Viscum album Agglutinin (VAA) lagen

biotinyliert vor. Es konnten bei den Lektinen Con A, LCA, PSA, RCA, WGA und WGAs Bindungsstellen sowohl in den Ductuli efferentes, als auch in Teilen des Ductus epididymidis nachgewiesen werden. Während SJA und PHA-E nur positive Ergebnisse in den Ductuli efferentes zeigten, reagierte PHA-L nur im Initialsegment des Ductus epididymidis.

Bei immunhistochemischen Untersuchungen wurden  $\alpha$ -SMA, Vimentin, Laminin, Panzytokeratine, die Cytokeratine 5, 8, 14, 18 und 19 sowie COX I in den Ductuli efferentes und dem Ductus epididymidis lokalisiert. Das Cytokeratin 7 konnte nicht nachgewiesen werden. Besonders die Untersuchungen mit dem Panzytokeratin-Antikörper, bei denen sich in den Ductuli efferentes die Zilienzellen und im Ductus epididymidis die Zellausläufer der Basalzellen deutlich darstellen ließen, waren interessant. Die Basalzellausläufer konnten auch bei allen Cytokeratin-Untersuchungen, ins besondere bei Cytokeratin 19 deutlich erkannt werden.

## VII. SUMMARY

### **Glycohistochemical, immunohistochemical and ultrastructural studies of the equine epididymis (*Equus ferus caballus*)**

The aim of my thesis was the examination of the epididymis of 20 clinically healthy horses of different age and race. The morphology and ultrastructure was analyzed using light- and electron microscopic techniques. The lectin binding pattern was analyzed by glycohistochemical methods. Immunohistochemical examinations were performed to study the cytoskeleton of cells of the equine epididymis. The structure of the equine epididymis is similar to that of other mammals. Using histological and cytological criteria, it can be divided into four segments: the ductuli efferentes, the initial segment, the middle segment and the terminal segment.

The epithel of the ductuli efferentes is composed of microvilli bearing principal cells and ciliated cells. The principal cells can be divided into three subtypes depending on the presence of vacuoles and granules. While the function of the principal cells is the resorption and secretion of the luminal fluid, ciliated cells mediate the transport of spermatozoa along within the epididymal duct. The epithelium of the ductus epididymis shows characteristic features in the different segments. Principal- and basal cells are found in every segment. Apical cells can be identified only in the initial- and middle segment.

The histochemical examination of the distribution of the carbohydrates in the equine epididymis was performed using 15 FITC-conjugated and three biotinylated lectins. The FITC-conjugated lectins were Canavalia ensiformis agglutinin (Con A), Lens culinaris agglutinin (LCA), Pisum sativum agglutinin (PSA), Arachis hypogaea agglutinin (PNA), Ricinus communis agglutinin (RCA), Erythrina cristagalli agglutinin (ECA), Glycine max agglutinin (SBA), Griffonia simplicifolia agglutinin I (GSL I), Saphora japonica agglutinin (SJA), Dolichos biflorus agglutinin (DBA), Triticum vulgare agglutinin (WGA), Triticum vulgare agglutinin succinylated (WGAs), Ulex europaeus agglutinin I (UEA I), Phaseolus vulgaris erythroagglutinin (PHA-E) and Phaseolus vulgaris leukoagglutinin (PHA-L). Maackia amurensis agglutinin I (MAA I), Sambucus nigra agglutinin (SNA) and Viscum album agglutinin (VAA) were conjugated with biotin. Binding

sites were found for Con A, LCA, PSA, RCA, WGA, and WGAs both in the ductuli efferentes and in some segments of the ductus epididymis. While SJA and PHA-E showed positive results in the ductuli efferentes only, PHA-L immunostained the epithelium of the initial segment of the ductus epididymis.

Using immunohistochemical techniques,  $\alpha$ -SMA, vimentin, laminin, pancytokeratin, the cytokeratins 5, 8, 14, 18 and 19 as well as COX I were localized in the ductuli efferentes and the ductus epididymis. The cytokeratin 7 was not detected. Antibodies to pancytokeratin clearly marked the ciliated cells of the ductuli efferentes and the basal cells of the epididymal duct, including their apical processes.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abd-Elmaksoud A (2009) Comparative expression of laminin and smooth muscle actin in the testis and epididymis of poultry and rabbit. *J Mol Histol*; 40: 407-16.

Acott TS, Hoskins DD (1978) Bovine sperm forward motility protein. partial purification and characterization. *J Biol Chem*; 253: 6744-50.

Alkafafy M (2005) Glycohistochemical, immunohistochemical and ultrastructural studies of the bovine epididymis. Inaugural-Dissertation, Ludwig Maximilians Universität München.

Alkafafy M, Rashed R, Emara S, Nada M, Helal A (2011) Histological and immunohistochemical studies on the epididymal duct in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Anat Cell Biol*; 44: 284-94.

Amann RP, Johnson L, Pickett BW (1977) Connection between the seminiferous tubules and the efferent ducts in the stallion. *Am J Vet Res*; 38: 1571-9.

Amann RP, Thompson DL Jr., Squires EL, Pickett BW (1979) Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. *J Reprod Fertil Suppl*: 1-6.

Arenas MI, de Miguel MP, Bethencourt FR, Fraile B, Royuela M, Paniagua R (1996) Lectin histochemistry in the human epididymis. *J Reprod Fertil*; 106: 313-20.

Arrighi S, Romanello MG, Domeneghini C (1993) Ultrastructure of epididymal epithelium in equus caballus. *Ann Anat*; 175: 1-9.

Arrighi S, Romanello MG, Domeneghini C (1994) Ultrastructure of the epithelium that lines the ductuli efferentes in domestic equidae, with particular reference to spermatophagy. *Acta Anat Basel*; 149: 174-84.

Arya M, Vanha-Perttula T (1984) Distribution of lectin binding in rat testis and epididymis. *Andrologia*; 16: 495-508.

Arya M, Vanha-Perttula T (1985) Lectin-binding pattern of bull testis and epididymis. *J Androl*; 6: 230-42.

Arya M, Vanha-Perttula T (1986) Comparison of lectin-staining pattern in testis and epididymis of gerbil, guinea pig, mouse, and nutria. *Am J Anat*; 175: 449-69.

Aureli G, Arrighi S, Romanello MG (1984) Ultrastructural and cytochemical study on the epithelium lining ductuli efferentes in equus asinus. *Basic Appl Histochem*; 28: 101-15.

Aurich C (2005) Physiologie der Fortpflanzungsfunktionen beim Hengst. In: *Reproduktionsmedizin beim Pferd*. Parey, Stuttgart.

Bader H (2006) Morphologische Fortpflanzungsstörungen, von den Nebenhoden ausgehende Störungen. In: *Handbuch Pferdepraxis*. Dietz O, Huskamp B eds. Enke Verlag Stuttgart.

Beck K, Hunter I, Engel J (1990) Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *Faseb J*; 4: 148-60.

Budras K-D (2009) Becken mit Leistengegend sowie Harn- und Geschlechtsorgane. In: *Atlas der Anatomie des Pferdes*. Schlütersche, Hannover: 84-6.

Busch W, Holzmann A (2001) *Veterinärmedizinische Andrologie*. Schattauer, Stuttgart.

Carr DW, Acott TS (1984) Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. studies of a sperm motility quiescence factor. *Biol Reprod*; 30: 913-25.

Chandler JA, Sinowatz F, Pierrepont CG (1981) The ultrastructure of dog epididymis. *Urol Res*; 9: 33-44.

Cheung KH, Leung GP, Leung MC, Shum WW, Zhou WL, Wong PY (2005) Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. *J Gen Physiol*; 125: 443-54.

Chokhawala HA, Huang S, Lau K, Yu H, Cheng J, Thon V, Hurtado-Ziola N, Guerrero JA, Varki A, Chen X (2008) Combinatorial chemoenzymatic synthesis and high-throughput screening of sialosides. *ACS Chem Biol*; 3: 567-76.

Cornwall GA (2009) New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update*; 15: 213-27.

Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F (2003) Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech*; 61: 7-17.

Egger GF, Witter, (2009) Peritubular contractile cells in testis and epididymis of the dog, *canis lupus familiaris*. *Acta vet. brno*; 78: 3-11.

Engel J, Odermatt E, Engel A, Madri JA, Furthmayr H, Rohde H, Timpl R (1981) Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J Mol Biol*; 150: 97-120.

Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest*; 119: 1763-71.

Fouchecourt S, Metayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL (2000) Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod*; 62: 1790-803.



Franz H (1990) 100 years of lectin research-a balance. *Naturwissenschaften*; 77: 103-9.

Gabius HJ, Engelhardt R, Cramer F (1986) Endogenous tumor lectins: overview and perspectives. *Anticancer Res*; 6: 573-8.

Gabius HJ, Rüdiger H (2009) Plant Lectins. In: *The Sugar Code*. Gabius HJ, ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KG: 301-15.

Gabius HJ, Andre S, Jimenez-Barbero J, Romero A, Solis D (2011) From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends Biochem Sci*; 36: 298-313.

Gallagher JT (1984) Carbohydrate-binding properties of lectins: a possible approach to lectin nomenclature and classification. *Review. Biosci Rep*; 4: 621-32.

Gebauer MR, Pickett BW, Swierstra EE (1974) Reproductive physiology of the stallion. 3. extra-gonadal transit time and sperm reserves. *J Anim Sci*; 39: 737-42.

Gerhards H (2003) Kastrationskomplikationen und Möglichkeiten zu deren Vermeidung: Chirurgische und forensische Betrachtungen. *Pferdeheilkunde*; 19: 37-44.

Ghetie V (1939) Präparation und Länge des Ductus epididymis beim Pferd und Schwein. *Anat. Anz.*; 87: 369-74.

Glover TD, Nicander L (1971) Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*; 13: Suppl 13:39-50.

Goldstein (1980) What should be called a lectin? *Nature*; 285: 66.

Goldstein IJ, Poretz RD (1986) Isolation, physicochemical and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. Liener IE, Sharon, N., Goldstein, I.J., ed. Orlando, San Diego: Academic Press: 33-247.

Habermann F, Andre S, Kaltner H, Kübler D, Sinowatz F, Gabius HJ (2011) Galectins as tools for glycan mapping in histology: comparison of their binding profiles to the bovine zona pellucida by confocal laser scanning microscopy. *Histochem Cell Biol*; 135: 539-52.

Hartmann M, Pabst MA, Schmied R, Caluba H-C, Dohr G (2009) Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie Licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas. Facultas Verlags- und Buchhandels AG; 4: 17-18.

Hees H, Sinowatz F (2000) Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.

Hemeida NA, Sack WO, McEntee K (1978) Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull, and stallion. *Am J Vet Res*; 39: 1892-900.

Herschman HR (1996) Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta*; 1299: 125-40.

Hess RA (2002) The efferent ductules: structure and functions. In: The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice Robaire BH, B.T., ed. New York: Kluwer Academic: 49-81.

Hesse M, Magin TM, Weber K (2001) Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci*; 114: 2569-75.

Ilio KY, Hess RA (1994) Structure and function of the ductuli efferentes: a review. *Microsc Res Tech*; 29: 432-67.

Jones R (2004) Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. *Biol Reprod*; 71: 1405-11.

Kietzmann M, Scherkl R, Schulz R (2002) Pharmakologie der Entzündung und der Allergie. In: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Frey H-H, Löscher W, eds. Enke Verlag, Stuttgart: 328-30.

Knibbs RN, Goldstein IJ, Ratcliffe RM, Shibuya N (1991) Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leukoagglutinating lectin from *maackia amurensis*. comparison with other sialic acid-specific lectins. *J Biol Chem*; 266: 83-8.

König HE, Liebich H-G (2002) Männliche Geschlechtsorgane. In: *Anatomie der Haussäugetiere, Band 2 Organe, Kreislauf- und Nervensystem*. Schattauer, Stuttgart.

Kreutzig T (2002) *Kurzlehrbuch Biochemie*. Urban & Fischer, München.

Kuhrau J (1994) Histologische, ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen an Hoden und Nebenhoden des Pferdes (*equus przewalskii* "caballus"). Inaugural-Dissertation, Ludwig Maximilians Universität München.

Leung GP, Cheung KH, Leung CT, Tsang MW, Wong PY (2004) Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol Cell Endocrinol*; 216: 5-13.

Liebich H-G (2004) *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. Schattauer, Stuttgart.

Lohr M, Kaltner H, Schwartz-Albiez R, Sinowatz F, Gabius HJ (2010) Towards functional glycomics by lectin histochemistry: strategic probe selection to monitor core and branch-end substitutions and detection of cell-type and regional selectivity in adult mouse testis and epididymis. *Anat Histol Embryol*; 39: 481-93.

Lopez ML, Grez P, Gribbel I, Bustos-Obregon E (1989) Cytochemical and ultrastructural characteristics of the stallion epididymis (equus caballus). *J Submicrosc Cytol Pathol*; 21: 103-20.

Lopez ML, Olea N, Retamal CA (2007) Post-testicular changes in the density and distribution of intramembrane particles of stallion sperm surface domains. *Anim Reprod Sci*; 100: 204-10.

Mecham RP (1991) Laminin receptors. *Annu Rev Cell Biol*; 7: 71-91.

Micheel F, Uchta R (1961) Synthese von Polysacchariden aus Disacchariden. *Die Makromolekulare Chemie*; 48: 17-23.

Mislin H (1961) Experimenteller Nachweis der autochthonen Automatie der Lymphgefäße. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 17: 29-30.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*; 31: 11-24.

Monsigny M, Roche AC, Sene C, Maget-Dana R, Delmotte F (1980) Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? *Eur J Biochem*; 104: 147-53.

Naden J, Amann RP, Squires EL (1990) Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. *J Reprod Fertil*; 88: 167-76.

Nicander L (1957) On the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in rabbits. *Acta Morphol Neerl Scand*; 1: 99-118.

Nicander L (1958) Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in stallions, rams and bulls. *Acta Morphol Neerl Scand*; 1: 337-62.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2004) Männliche Geschlechtsorgane. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 2, Eingeweide*. Parey Verlag, Berlin.

Palacios J, Regadera J, Nistal M, Paniagua R (1991) Apical mitochondria-rich cells in the human epididymis: an ultrastructural, enzymohistochemical and immunohistochemical study. *Anat Rec*; 231: 82-8.

Palacios J, Regadera J, Paniagua R, Gamallo C, Nistal M (1993) Immunohistochemistry of the human ductus epididymis. *Anat Rec*; 235: 560-6.

Pallari HM, Eriksson JE (2006) Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci STKE*: pe53.

Parillo F, Stradaoli G, Supplizi AV, Monaci M (1997) Detection of glycoconjugates in the ductus epididymis of the prepubertal and adult horse by lectin histochemistry. *Histol Histopathol*; 12: 691-700.

Parillo F, Stradaoli G, Supplizi AV, Monaci M (1998) Lectin-staining pattern in extratesticular rete testis and ductuli efferentes of prepubertal and adult horses. *Histol Histopathol*; 13: 307-14.

Peumans WJ, Van Damme EJ (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*; 109: 347-52.

Philipp E (2011) Funktionelle Morphologie des Nebenhodens des Hundes (*Canis familiaris*) unter besonderer Berücksichtigung der Basalzellen. Inaugural-Dissertation, Ludwig Maximilians Universität München.

Prem J (1992) Histologische, ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen an Hoden und Nebenhoden der Katze. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Rauscher S (1991) Nachweis von Lektinbindungsstellen und endogenen Lektinen im Nebenhoden des Rindes. Inaugural-Dissertation, Ludwig Maximilians Universität München.

Retamal C, Urzua J, Alves EW, Lopez ML (2000) Cytochemical and electrophoretic study of the stallion epididymal glycoproteins. *J Submicrosc Cytol Pathol*; 32: 117-30.

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*; 17: 208-12.

Robaire B, Hinton B (2002) The Epididymis: From molecules to clinical practice. Kluwer, New York.

Rohde H, Wick G, Timpl R (1979) Immunochemical characterization of the basement membrane glycoprotein laminin. *Eur J Biochem*; 102: 195-201.

Romeis (2010) Mikroskopische Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Roth J (2011) Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochem Cell Biol*; 136: 117-30.

Rüdiger H (1981) Lectine: Vorkommen, Anwendung und Funktion. *Chemie in unserer Zeit*; 15: 155-62.

Rüdiger H (1982) Phythemagglutinins. *Planta Med*; 46: 3-9.

Rüdiger H (1998) Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat Basel*; 161: 130-52.

Ruff (2005) Ultrastrukturelle und immunhistochemische Untersuchungen am Nebenhoden des Katers. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Rüsse I, Sinowatz F (1998) Spermatogenese. In: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Parey, Berlin.

Sanchez B, Flores JM, Pizarro M, Garcia P (1998) Histological and immunohistochemical study of the cat epididymis. *Anat Histol Embryol*; 27: 135-40.

Schick B (2006) Immunhistochemische, ultrastrukturelle und glykohistochemische Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Schottelius J (1982) The identification by lectins of two strain groups of *trypanosoma cruzi*. *Z Parasitenkd*; 68: 147-54.

Schottelius J, da Costa SC (1982) Studies on the relationship between lectin binding carbohydrates and different strains of *leishmania* from the new world. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 77: 19-27.

Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DA, Rogers MA, Wright MW (2006) New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*; 174: 169-74.

Sharon N, Lis H (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*; 14: 53R-62R.

Shum WW, Da Silva N, McKee M, Smith PJ, Brown D, Breton S (2008) Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*; 135: 1108-17.

Shum WW, Da Silva N, Brown D, Breton S (2009) Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *J Exp Biol*; 212: 1753-61.

Sinowatz F (1981) Ultrastrukturelle und enzymhistochemische Untersuchungen am Ductus epididymidis des Rindes. *Zentralblatt fuer Veterinaermedizin; Beiheft* 32.

Skalli O, Pelte MF, Peclet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L (1989) Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem*; 37: 315-21.

Soderstrom KO, Malmi R, Karjalainen K (1984) Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. enhancement of lectin fluorescence obtained by fixation in Bouin's fluid. *Histochemistry*; 80: 575-9.

Sostaric E, Aalberts M, Gadella BM, Stout TA (2008) The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim Reprod Sci*; 107: 237-48.

Swierstra EE, Gebauer MR, Pickett BW (1974) Reproductive physiology of the stallion. I. Spermatogenesis and testis composition. *J Reprod Fertil*; 40: 113-23.



Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR (1979) Laminin-a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*; 254: 9933-7.

Van Damme EJM, Peumans, W.J., Barre, A., Rougé, P (1998) Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*; 17: 575-692.

Vane JR (1994) Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; 91.

Watanabe M, Muramatsu T, Shirane H, Ugai K (1981) Discrete distribution of binding sites for dolichos biflorus agglutinin (DBA) and for peanut agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. *J Histochem Cytochem*; 29: 779-80.

Wehrend A, Hetzel U, Huchzermeyer S, Klein C, Bostedt H (2004) Sirius red is able to selectively stain eosinophil granulocytes in bovine, ovine and equine cervical tissue. *Anat Histol Embryol*; 33: 180-2.

Wieland G (1994) Lichtmikroskopische, ultrastrukturelle und glykohistochemische Untersuchungen am Spermium des Pferdes (*Equus caballus*). Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wrobel K-H (1990) Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. Parey, Berlin und Hamburg.

**IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1 Schematische Darstellung des speziesspezifischen Übergangs der Ductuli efferentes (D.eff.) in den Ductus epididymidis (D.ep.) modifiziert nach Ilio und Hess (ILIO & HESS, 1994).....	3
Abbildung 2 Schematische Darstellung der zellulären Organisation einer repräsentativen Zelle aus der Nebenhoden der Ratte. Modifiziert nach (CORNWALL, 2009). ....	6

**X. TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1 Beispiele für Lektine in der Einteilung nach Gallagher.....	14
Tabelle 2 Einteilung ausgewählter Lektine nach ihrer Zuckerspezifität.....	15
Tabelle 3 Klassen der Intermediärfilamente .....	21
Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Tiere .....	25
Tabelle 5 Übersicht der verwendeten mit Biotin konjugierten Lektine.....	34
Tabelle 6 Übersicht der verwendeten mit FITC-markierten Lektine.....	35
Tabelle 7 Übersicht über die verwendeten Antikörper .....	40
Tabelle 8 Histomorphologische Befunde der Ductuli efferentes.....	50
Tabelle 9 Histomorphologische Befunde des Initialsegments .....	55
Tabelle 10 Histomorphologische Befunde des Mittelsegments.....	58
Tabelle 11 Histomorphologische Befunde des Terminalsegments.....	61
Tabelle 12 Übersicht über die Con A-Bindungsstellen.....	62
Tabelle 13 Übersicht über die LCA-Bindungsstellen .....	63
Tabelle 14 Übersicht über die PSA-Bindungsstellen.....	64
Tabelle 15 Übersicht über die RCA-Bindungsstellen.....	65
Tabelle 16 Übersicht über die SJA-Bindungsstellen .....	66
Tabelle 17 Übersicht über die WGA-Bindungsstellen.....	67
Tabelle 18 Übersicht über die WGAs-Bindungsstellen.....	68
Tabelle 19 Übersicht über die PHA-E-Bindungsstellen .....	68
Tabelle 20 Übersicht über die PHA-L-Bindungsstellen .....	69
Tabelle 21 Übersicht über die SNA-Bindungsstellen .....	70
Tabelle 22 Immunhistochemischer Nachweis von $\alpha$ -SMA .....	76
Tabelle 23 Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin .....	79
Tabelle 24 Immunhistochemischer Nachweis von Laminin.....	82
Tabelle 25 Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin .....	85
Tabelle 26 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 5.....	88
Tabelle 27 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 8.....	91
Tabelle 28 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 14.....	94
Tabelle 29 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 18.....	97
Tabelle 30 Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 19.....	100
Tabelle 31 Immunhistochemischer Nachweis der Cyclooxygenase I .....	103

## **XI. BILDERVERZEICHNIS**

Bild 1 Makroskopische Einteilung des Nebenhodens.....	46
Bild 2 Ductuli efferentes, Goldner-Färbung, SB = 40 µm.....	48
Bild 3 Ductuli efferentes, H.E.-Färbung, SB = 10 µm.....	48
Bild 4 Ductuli efferentes, HE-Färbung, SB = 40 µm.....	48
Bild 5 Ductuli efferentes, Alcianblau-Färbung pH = 2,5, SB = 40 µm .....	48
Bild 6 Ductuli efferentes, PAS-Färbung, SB = 100 µm.....	49
Bild 7 Initialsegment, Goldner-Färbung, SB = 100 µm.....	53
Bild 8 Initialsegment, H.E.-Färbung, SB = 40 µm .....	53
Bild 9 Initialsegment, PAS-Färbung, SB = 100 µm .....	53
Bild 10 Initialsegment, Alcianblau pH = 2,5, SB = 40 µm.....	53
Bild 11 Initialsegment, PAS-Färbung, SB = 100µm .....	54
Bild 12 Mittelsegment, Goldner-Färbung, SB = 100 µm .....	57
Bild 13 Mittelsegment, H.E.-Färbung, SB = 40 µm .....	57
Bild 14 Mittelsegment, PAS-Färbung, SB = 100 µm .....	57
Bild 15 Mittelsegment, PAS-Färbung mit Amylase-Behandlung, SB = 40 µm ...	57
Bild 16 Terminalsegment, Goldner-Färbung, SB = 250 µm.....	60
Bild 17 Terminalsegment, H.E.-Färbung, SB = 40 µm .....	60
Bild 18 Terminalsegment, Alcianblau-Färbung pH-Wert = 2,5, SB = 40 µm.....	60
Bild 19 Terminalsegment, PAS-Färbung, SB = 100 µm .....	60
Bild 20 Ductuli efferentes, Con A-Bindung, SB = 50 µm.....	71
Bild 21 Terminalsegment, Con A-Bindung, SB = 50 µm.....	71
Bild 22 Ductuli efferentes, LCA-Bindung, SB = 50 µm .....	71
Bild 23 Mittelsegment, LCA- Bindung, SB = 50 µm .....	71
Bild 24 Ductuli efferentes, PSA-Bindung, SB = 50 µm .....	72
Bild 25 Mittelsegment, PSA-Bindung, SB = 50 µm.....	72
Bild 26 Initialsegment, WGA-Bindung, SB = 50 µm.....	72
Bild 27 Terminalsegment, WGA-Bindung, SB = 50 µm.....	72
Bild 28 Mittelsegment, WGAs-Bindung, SB = 50 µm.....	73
Bild 29 Initialsegment, PHA-L-Bindung, SB = 50 µm.....	73
Bild 30 Ductuli efferentes, SNA-Bindung, SB = 50 µm .....	73
Bild 31 Mittelsegment, SNA-Bindung, SB = 50 µm.....	73
Bild 32 Ductuli efferentes, SMA-Nachweis, SB = 100 µm.....	75

Bild 33 Initialsegment, SMA-Nachweis, SB = 100 µm.....	75
Bild 34 Mittelsegment, SMA-Nachweis, SB = 100 µm .....	75
Bild 35 Terminalsegment, SMA-Nachweis, SB = 100 µm.....	75
Bild 36 Ductuli efferentes, Vimentin-Nachweis, SB = 40 µm .....	78
Bild 37 Initialsegment, Vimentin-Nachweis, SB = 100 µm .....	78
Bild 38 Mittelsegment, Vimentin-Nachweis, SB = 100 µm.....	78
Bild 39 Terminalsegment, Vimentin-Nachweis, SB = 40 µm .....	78
Bild 40 Ductuli efferentes, Laminin-Nachweis, SB = 100 µm.....	81
Bild 41 Initialsegment, Laminin-Nachweis, SB = 100 µm.....	81
Bild 42 Mittelsegment, Laminin-Nachweis, SB = 40 µm.....	81
Bild 43 Terminalsegment, Laminin-Nachweis, SB = 100 µm.....	81
Bild 44 Ductuli efferentes, Panzytokeratin-Nachweis, SB = 40 µm .....	84
Bild 45 Initialsegment, Panzytokeratin-Nachweis, SB = 100 µm .....	84
Bild 46 Mittelsegment, Panzytokeratin-Nachweis, SB = 40 µm .....	84
Bild 47 Terminalsegment, Panzytokeratin-Nachweis, SB = 40 µm .....	84
Bild 48 Ductuli efferentes, CK 5-Nachweis, SB = 40 µm.....	87
Bild 49 Initialsegment, CK 5-Nachweis, SB = 100 µm.....	87
Bild 50 Mittelsegment, CK 5-Mittelsegment, SB = 100 µm .....	87
Bild 51 Terminalsegment, CK 5-Nachweis, SB = 40 µm.....	87
Bild 52 Ductuli efferentes, CK 8-Nachweis, SB = 40 µm.....	90
Bild 53 Initialsegment, CK 8-Nachweis, SB = 100 µm.....	90
Bild 54 Mittelsegment, CK 8-Nachweis, SB = 100 µm .....	90
Bild 55 Terminalsegment, CK 8-Nachweis, SB = 40 µm.....	90
Bild 56 Ductuli efferentes, CK 14-Nachweis, SB = 40 µm.....	93
Bild 57 Initialsegment, CK 14-Nachweis, SB = 40 µm.....	93
Bild 58 Mittelsegment, CK 14-Nachweis, SB = 40 µm .....	93
Bild 59 Terminalsegment, CK 14-Nachweis, SB = 100 µm.....	93
Bild 60 Ductuli efferentes, CK 18-Nachweis, SB = 100 µm.....	96
Bild 61 Initialsegment, CK 18-Nachweis, SB = 100 µm.....	96
Bild 62 Mittelsegment, CK 18-Nachweis, SB = 100 µm .....	96
Bild 63 Terminalsegment, CK 18-Nachweis, SB = 100 µm.....	96
Bild 64 Ductuli efferentes, CK 19-Nachweis, SB = 40 µm.....	99
Bild 65 Initialsegment, CK 19-Nachweis, SB = 40 µm.....	99
Bild 66 Mittelsegment, CK 19-Nachweis, SB = 40 µm .....	99
Bild 67 Terminalsegment, CK 19-Nachweis, SB = 40 µm.....	99

---

Bild 68 Ductuli efferentes, COX I-Nachweis, SB = 50 µm.....	102
Bild 69 Initialsegment, COX I-Nachweis, SB = 50 µm.....	102
Bild 70 Mittelsegment, COX I-Nachweis, SB = 50 µm .....	102
Bild 71 Terminalsegment, COX I-Nachweis, SB = 50 µm .....	102
Bild 72 Überblick über das Epithel der Ductuli efferentes, SB = 5 µm .....	106
Bild 73 Hauptzellen der Ductuli efferentes, SB = 3 µm .....	107
Bild 74 Haupt- und Zilienzellen der Ductuli efferentes, SB = 3 µm .....	108
Bild 75 Zellverbindungen im apikalen Epithelbereich der Ductuli efferentes, SB = 0,5 µm .....	109
Bild 76 Zellverbindungen in den Ductuli efferentes, SB = 3 µm .....	110
Bild 77 Übersicht über das Epithel im Initialsegment, SB = 5 µm.....	113
Bild 78 Basal- und Hauptzellen im Initialsegment, SB = 5 µm.....	114
Bild 79 Apikaler Epithelbereich im Initialsegment, SB = 1 µm.....	115
Bild 80 Hauptzellen im Initialsegment, SB = 5 µm.....	116
Bild 81 Zytoplasma der Hauptzellen im Initialsegment, SB = 5 µm.....	117
Bild 82 Basaler Epithelbereich im Initialsegment, SB = 2,5 µm.....	118
Bild 83 Hauptzellen im Mittelsegment, SB = 2,5 µm.....	120
Bild 84 Basaler Epithelbereich im Mittelsegment, SB = 3 µm.....	121
Bild 85 Zellorganellen der Hauptzellen im Mittelsegment, SB = 2,5 µm .....	122
Bild 86 Apikales Zytoplasma im Mittelsegment, SB = 1 µm.....	123
Bild 87 Spermien im Mittelsegment, SB = 2,5 µm.....	124
Bild 88 Mastzelle im Mittelsegment, SB = 1 µm .....	125
Bild 89 Apikaler Bereich des Terminalsegments, SB = 5 µm.....	127
Bild 90 Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum, SB = 1 µm .....	128
Bild 91 Zellverbindungen im apikalen Epithelbereich, SB = 0,5 µm.....	129
Bild 92 Apikales Zytoplasma der Hauptzellen, SB = 2,5 µm.....	130
Bild 93 Terminalsegment, basaler Epithelbereich, SB = 2,5 µm.....	131

## **XII. ANHANG**

### **1. Methodik - Lichtmikroskopie**

#### **1.1. Fixierungslösungen**

##### **Bouin**

750 ml gesättigte wässrige Pikrinsäure (Firma Merck, Darmstadt)

250 ml Formaldehyd 37 % (Firma Merck, Darmstadt)

50 ml Eisessig (Firma Merck, Darmstadt)

##### **Formalin**

Formaldehyd 37 % im Verhältnis 1 : 10 mit PBS Puffer verdünnen

##### **Puffer**

##### **PBS Puffer pH 7,4**

42,50 g NaCl (Natriumchlorid) (Firma Merck, Darmstadt)

6,35 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Di-Na-hydrogenphosphat-dihydrat)

(Firma Merck, Darmstadt)

1,95 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (Na-dihydrogenphosphat-1-hydrat)

(Firma Merck, Darmstadt)

Aqua dest. ad 5 l

##### **Citratpuffer pH 6,0**

Stammlösung A: 21,01 g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$  (Citrat)

(Firma Merck, Darmstadt)

Aqua dest. ad 1 l

Stammlösung B: 29,42 g  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Natriumcitrat)

(Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Aqua dest. ad 1 l

Gebrauchslösung: 9 ml Lösung A  
41 ml Lösung B  
Aqua dest. ad 500 ml

## 1.2. Lösungen

### Hämalaun

2,0 g Hämatoxylin  
0,4 g  $\text{NaJO}_3$  (Natriumjodat)  
100 g  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Aluminiumkaliumsulfat)  
100 g  $\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$  (Chloralhydrat)  
2,0 g kristalline Zitronensäure  
Aqua dest. ad 2 l

### Eosin

Stammlösung: 2,0 g Eosin  
198 ml Aqua dest.  
einige Tropfen Formol (zur Haltbarkeitsteigerung)  
Gebrauchslösung: 60 ml Stammlösung  
8 Tropfen Eisessig  
600 ml Aqua dest.

### 0,5 % wässrige Lösung von Perjodsäure

0,5 g  $\text{H}_5\text{IO}_6$  (Perjodsäure)  
100 ml Aqua dest.

### $\text{SO}_2$ (Schwefeldioxid) -Wasser

200 ml Leitungswasser  
10 ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (Natrium-Pyrosulfit)-Lösung  
10 ml n-HCl (900 ml Aqua dest. und 100 ml HCl konzentriert)



**Essigsäure-Pyridin-Lösung**

16 ml  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$  (Essigsäureanhydrid)

24 ml  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$  (Pyridin)

**0,1 n-Salzsäure-Methanol (absolut)-Lösung:**

n-HCl

$\text{CH}_4\text{O}$  (Methanol) im Verhältnis 1 : 10

**Eisenhämatoxylin nach Weigert**

Lösung A: 1,0 g Hämatoxylin

100 ml 96% Alkohol

Lösung B: 2,48 g  $\text{FeCl}_3$  (Eisen(III)chlorid)

100 ml Aqua dest.

1 ml konzentrierte HCl 37 % (Salzsäure)

Gebrauchslösung: Lösung A

Lösung B im Verhältnis 1 : 1

**Azophloxin**

0,5 g Azophloxin

100 ml Aqua dest.

0,2 ml Eisessig

**Phosphormolybdänsäure-Orange**

3-5 g Phosphormolybdänsäure oder Phosphorwolframsäure

100 ml Aqua dest.

2,0 g Orange G

**Lichtgrün**

0,1 - 0,2 g Lichtgrün

100 ml Aqua dest.

**Essigsäure 1 % / 3 %**

10/30 ml Eisessig

1 l Aqua dest.

**Alcianblau pH 1,0**

1 g Alcianblau 8 GX (Firma Merck, Darmstadt)

100 ml 0,1 N-HCl

pH 1,0 einstellen

Thymolkristall

**Alcianblau pH 2,5**

1 g Alcianblau 8 GX

100 ml 3 % Essigsäure

pH 2,5 einstellen

Thymolkristall

**Sirius Red**

500 mg Sirius Red

45 ml Aqua bidest.

50 ml Alkohol absolut

1 ml 1%iges NaOH (Natriumhydroxid)

4 ml 20%iges NaCl

**DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)-Hydrogenperoxid-Lösung**

Stammlösung: 5 ml PBS-Puffer

15 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Gebrauchslösung: 6 DAB-Tabletten (Firma Dako, Hamburg)

60 ml Aqua dest. auflösen

400 µl Stammlösung

## 2. Methodik - Elektronenmikroskopie

### 2.1. Fixierungslösung nach Karnovsky

10% Paraformaldehyd-Lösung:

10 g Paraformaldehyd

(Firma Merck, Darmstadt)

100 ml Aqua dest.

1-2 Tropfen 1 N NaOH

(Firma Carl Roth, Karlsruhe)

Stammlösung: 20 ml Paraformaldehyd-Lösung (10%)

50 ml 0,2 M-Cacodylat-Puffer

0,05 g  $\text{CaCl}_2$  (Kalziumchlorid)

(Firma Merck, Darmstadt)

Gebrauchslösung: 10 ml Stammlösung

1,37 ml 25 % Glutaraldehyd

(Polysciences Inc., Warrington, USA)

### 2.2. Cacodylat-Puffer

Stammlösung: 8,56 g  $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$

(Natriumcacodylat)

(Polysciences Inc., Warrington, USA)

200 ml Aqua dest.

0,2M-Lösung: 50 ml Stammlösung

tropfenweise 0,2 M HCl bis pH 7,2

(Firma Merck, Darmstadt)

Aqua dest. ad 100 ml

0,1M-Lösung: 50 ml 0,2 M-Lösung

50 ml Aqua dest.

### 2.3. Lösungen

#### **Kontrastierungslösung**

2 %  $\text{OsO}_4$  (Osmiumtetroxid)-Lösung:

2 ml 4 %  $\text{OsO}_4$

(Polysciences Inc., Warrington, USA)

2 ml 0,1 M Cacodylat-Puffer

3 %  $\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$  (Kaliumferrocyanid)-Lösung:

0,3 g  $\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$

(Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

0,1 M-Cacodylat-Puffer ad 10 ml

Osmiumtetroxid(1%)-Kaliumferrocyanid(1,5 %) in 0,1M-Cacodylatpuffer:

4 ml 2 %  $\text{OsO}_4$ -Lösung

4 ml 3 %  $\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$ -Lösung

#### **Bleicitrat-Lösung nach Reynolds (pH ~ 12)**

0,266 g  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (Bleinitrat)

(Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

0,352 g  $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Natriumcitrat)

(Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

6 ml Aqua dest.

ca. 1,6 ml 1 N NaOH für pH-Wert

#### **Uranylacetat**

Uranylacetat (Firma Scientific LTD, Stansted, UK)

Aqua dest. bis zur gesättigten Lösung

#### **Methylenblau nach Richardson**

Stammlösung: 1 % Methylenblau (Firma Merck, Darmstadt)

1 % Borax  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

(Natriumtetraboratdecahydrat p.A.)

(Firma Serva, Heidelberg)

im Verhältnis 1 : 1

Gebrauchslösung: 1 % Azur II

(Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & CO,  
Münster)

Stammlösung

im Verhältnis 1 : 1

### **Polyembed-Einbettung**

20 ml Poly/Bed 812 (Polysciences Inc., Warrington, USA)

16 ml DDSA (Polysciences Inc., Warrington, USA)

10 ml NMA (Polysciences Inc., Warrington, USA)

1,4 ml BDMA (Polysciences Inc., Warrington, USA)



### **XIII. DANKSAGUNG**

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz möchte ich mich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die jederzeitige freundliche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken. Für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Abbildungen bin ich ihm ebenfalls sehr dankbar.

Bei Frau Dr. Kenngott und Frau Dr. Ebach möchte ich mich vielmals sowohl für ihre fachliche Unterstützung als auch für die netten Gespräche bedanken. Ich hoffe wir sehen uns auf der ein- oder anderen Tagung wieder.

Frau Rußmeier, Frau Settles und Herrn Gök danke ich für die Einarbeitung und Hilfe bei den lichtmikroskopischen, glykohistochemischen und immunhistochemischen Arbeiten im Labor.

Bei Frau Scholz und Frau Neumüller möchte ich mich für ihren engagierten Einsatz bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen bedanken. Frau Kazior danke ich für die Hilfe bezüglich aller organisatorischen Fragen.

Ein großer Dank geht an die fachtierärztliche Praxis Dr. Niederacher und insbesondere an Frau Dr. Heisse, mit der ich zahlreiche Hengste kastriert habe und somit die Probensammlung sichergestellt war. Mir ist bewusst, dass ohne die Rücksichtnahme in der Dienstplanung es mir nicht möglich gewesen wäre, die praktische Arbeit als Tierärztin und die Erstellung dieser Dissertation parallel zu schaffen. Vielen Dank dafür!

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinem Freund Thomas, der mich neben seiner geduldigen Hilfe mit allen PC-Problemen auch mit unendlich viel Zuspruch und Motivation in Krisenzeiten unterstützt hat. Ohne Dich hätte ich diese Arbeit nicht fertig gestellt, tausend Dank dafür!

Meiner Mama und meinem Papa widme ich diese Arbeit, aus Dank für ihr unglaubliches Vertrauen in mich. Ihr habt immer an mich geglaubt, vielen Dank!